



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SIENA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Specializzazione in Genetica Medica

Indirizzo Medico

**ESPERIENZA CLINICA IN
CONSULENZE GENETICHE PER
SINDROME DI ALPORT**

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa
ALESSANDRA RENIERI

Tesi di Specializzazione di:
Dott.ssa VERA ULIANA

Anno Accademico 2008/2009

INDICE

| | |
|--|---------|
| 1. Consulenze genetiche : esperienza personale | pag 3 |
| 1.1 Pazienti con ritardo mentale ed altre anomalie associate | pag 4 |
| 1.2 Consulenze di Genetica Oncologica | pag 7 |
| 1.3 Malattie neurologiche dell'adulto | pag 9 |
| 1.4 Consulenze genetiche prenatali e preconcezionali | pag 11 |
| 1.5 Altre consulenze genetiche | pag 13 |
| 1.6 Consulenze genetiche per sindrome di Alport | pag 15 |
| 2. La sindrome di Alport | pag 17 |
| 2.1 Panoramica storica | pag 19 |
| 2.2 Patogenesi | pag 20 |
| 2.3 Quadro clinico | pag 24 |
| 2.4 Aspetti terapeutici | pag 27 |
| 2.5 Sindrome di Alport X-legata | pag 30 |
| 2.6 Sindrome di Alport Autosomica Recessiva | pag 33 |
| 2.7 Sindrome di Alport Autosomica Dominante | pag 35 |
| Autosomal Dominant Alport syndrome: molecular analysis of the <i>COL4A4</i> gene and clinical outcome. Marcocci E, Uliana V, Bruttini M, Artuso R, Silengo MC, Zerial M, Bergesio F, Amoroso A, Savoldi S, Pennesi M, Giachino D, Rombolà G, Fogazzi GB, Rosatelli C, Martinhago CD, Carmellini M, Mancini R, Di Costanzo G, Longo I, Renieri A, Mari F. <i>Nephrol Dial Transplant.</i> 2009May; 24(5):1464-71. Epub 2009 Jan 7 | |
| 2.8 Microematuria familiare benigna | pag 43 |
| 2.9 Sindrome di Alport e Leiomiomatosi | pag 45 |
| Alport syndrome and leiomyomatosis: description of three cases Uliana V, D'Esposito D, Katzaki E, Papa FT, Meloni I, Izzi C, Manno C, Bruttini M, Mari F, Scolari F, Renieri A, Salviati L. <i>Ped Nephrol</i> In press | |
| 3. Materiali e Metodi | pag 56 |
| 3.1 Analisi di mutazioni puntiformi | pag 57 |
| 3.11 PCR | pag 57 |
| 3.12 DHPLC | pag 58 |
| 3.11 Sequenziamento automatico | pag 60 |
| 3.2 Analisi di grossi riarrangiamenti | pag 61 |
| 3.21 MLPA | pag 61 |
| 3.22 Array-CGH | pag 63 |
| 4. Consulenze genetiche nella sindrome di Alport: esperienza clinica personale | pag 65 |
| 5. Discussione | pag 102 |
| 6. Bibliografia | pag 108 |

1. CONSULENZE GENETICHE

L'attività effettuata durante la specializzazione in Genetica Medica presso l'UOC Genetica Medica dell'Università di Siena, diretta dalla professoressa Alessandra Renieri, si è svolta essenzialmente nell'ambito della genetica clinica. In tal senso, ho partecipato attivamente a più di 500 consulenze genetiche.

La consulenza genetica è un processo comunicativo che ha lo scopo di fornire agli individui e alle famiglie che hanno una malattia genetica o sono a rischio di averla, un'informazione completa sulla loro condizione, di analizzare le conseguenze personali di questa informazione e di aiutare le coppie a rischio a prendere delle decisioni responsabili sui loro rischi riproduttivi. La consulenza genetica, quindi, riguarda i problemi associati alla ricorrenza, o al rischio di ricorrenza, di una malattia genetica in una famiglia. Questo processo implica il tentativo di uno o più esperti di aiutare il singolo individuo o la famiglia a conoscere la situazione clinica, il probabile decorso della malattia e le terapie disponibili; a comprendere le modalità di trasmissione ed il rischio di ricorrenza in alcuni dei parenti; a valutare tutte le alternative sulla base di un determinato rischio di ricorrenza; ed infine a prendere le decisioni migliori in base al loro rischio, alle loro intenzioni, alle loro convinzioni etiche e religiose.

I motivi principali per cui è indicata una consulenza genetica sono:

- malattia ereditaria nota o sospetta in un paziente o in una famiglia
- difetti congeniti e/o ritardo mentale:
- gravidanza in donne con più di 35 anni
- storia familiare di cancro con insorgenza in età giovanile
- test genetici predittivi di malattia ad insorgenza nell'adulto
- storia di infertilità di coppia ed aborti ripetuti
- esposizione a teratogeni in gravidanza

1.1 PAZIENTI CON RITARDO MENTALE ED ALTRE ANOMALIE ASSOCIATE

Il maggior numero di consulenze genetiche cui ho partecipato erano rivolte a pazienti, in genere bambini, con anomalie congenite e/o ritardo mentale (Tabella 1). In questo ambito, il genetista clinico effettua un'accurata valutazione diagnostica, anche per valutare se il probando possa essere inquadrato nell'ambito di una sindrome monogenica o di un difetto cromosomico.

Nei probandi inquadrabili in una sindrome nota, la consulenza genetica costituisce una parte importante dell'assistenza del paziente, anche se non c'è una cura specifica, e può permettere ai genitori e ad altri individui della famiglia di assumere delle decisioni responsabili sui loro rischi riproduttivi. Possiamo considerare ad esempio la sindrome di Rett, una patologia di cui l'UOC Genetica Medica è centro di riferimento nazionale ed internazionale. La sindrome di Rett è un disordine neurologico dello sviluppo, che si manifesta nella prima infanzia e colpisce quasi esclusivamente le bambine, nelle quali rappresenta la seconda causa di ritardo mentale. Caratteristiche cliniche tipiche della sindrome sono il ritardo dello sviluppo psicomotorio, la microcefalia acquisita, le stereotipie manuali tipo lavaggio, le alterazioni del respiro e della circolazione periferica, le difficoltà di alimentazione con reflusso gastro-esofageo. Oltre alla forma classica della sindrome di Rett, causata da mutazioni nel gene *MECP2*, se ne conoscono alcune varianti, quali: la forma a linguaggio conservato o variante Zappella, la variante con convulsioni ad esordio precoce o variante di Hanefeld, la variante congenita e le forme fruste. Se il sospetto clinico di Sindrome di Rett in una bambina viene confermato dal riscontro di una mutazione nel gene *MECP2*, nella maggior parte dei casi è una mutazione insorta de novo al momento del concepimento ed è assente nei genitori. In tal caso, quindi, il rischio di ricorrenza per eventuali future gravidanze è molto basso. Poiché non si può escludere a priori un mosaicismo germinale, nel caso di ulteriori gravidanze della coppia viene comunque offerta la possibilità di una diagnosi prenatale con ricerca della stessa mutazione riscontrata nella bimba affetta. In questo caso, quindi, la consulenza genetica e la successiva analisi molecolare consentono una corretta diagnosi e di effettuare una corretta valutazione del rischio di ricorrenza.

La maggior parte dei pazienti con anomalie congenite e/o ritardo mentale (MCA/MR, multiple congenital anomalies/mental retardation), non sono comunque inquadrabili in un quadro noto. Occorre sottolineare che le strategie di approccio a tali pazienti sono state recentemente rivoluzionate dall'introduzione della tecnica dell'Array-CGH. Tale analisi condotta su pazienti con ritardo mentale e un fenotipo clinico non suggestivo di uno specifico

quadro sindromico, valutati in consulenza genetica presso la Genetica Medica dell'Università di Siena, ha permesso di identificare in circa il 15% dei casi un riarrangiamento cromosomico patogenetico, comprese microdelezioni/microduplicazioni, riarrangiamenti complessi e sindromi note in pazienti con fenotipo atipico. Nel sottogruppo che ho valutato in consulenza personalmente, l'analisi di Array-CGH ha permesso di identificare 3 nuove sindromi da delezioni¹, 2 sindromi da microduplicazione e 3 sindromi da microdelezione note difficilmente riconoscibili su base clinica, di cui una microdelezione 22q11 in una paziente con associazione MURCS², una paziente con delezione del braccio lungo del cromosoma 18 ed una sindrome di Smith-Magenis. L'Array-CGH in pazienti MCA/MR in casi selezionati permette, oltre un inquadramento diagnostico del singolo paziente, di identificare geni responsabili di malattie monogeniche tramite l'approccio del gene candidato. Possiamo considerare ad esempio l'identificazione del gene *FOXP1* come responsabile della variante congenita della sindrome di Rett. L'identificazione di una microdelezione del braccio lungo del cromosoma 14 in una paziente con fenotipo clinico sovrapponibile a variante congenita della sindrome di Rett, ha indotto a studiare i geni compresi nella microdelezione e ad identificare come gene candidato a tale patologia il gene *FOXP1*. La successiva analisi mutazionale del gene in un gruppo di pazienti con variante congenita della sindrome di Rett ha confermato che mutazioni nel gene *FOXP1* sono responsabili di tale fenotipo³.

Tabella 1 Consulenza in pazienti con ritardo mentale e/o altre anomalie congenite

| MALATTIA | NUMERO |
|---|---------------|
| Sindromi da microdelezione/duplicazione | 8 |
| Microdelezioni | 3 |
| Microduplicazioni | 2 |
| Sindromi note da microdelezioni (18p-, del22q11, Smith-Magenis) | 3 |
| Sindrome di Rett | 10 |
| Classica | 7 |
| Variante con convulsioni ad esordio precoce | 2 |
| Variante Congenita | 1 |
| Sindrome di Angelman | 2 |
| Sindrome degli spasmi infantili | 5 |
| Sindrome di Cohen | 3 |
| Sindromi da overgrowth | 6 |
| Disturbi dello sviluppo sessuale | 6 |
| Sindromi da instabilità cromosomica | 4 |
| Sindrome de La Tourette | 4 |
| Sindromi dello spettro Noonan | 3 |
| Disturbi della migrazione neuronale | 3 |
| Neurofibromatosi | 2 |
| Craniostenosi | 2 |
| Fibrosi cistica | 2 |
| Altre sindromi ed associazioni | 16 |
| Sindrome di Pitt-Hopkins | 1 |
| Sindrome di Mowat-Wilson | 1 |
| Osteodistrofia di Albright | 1 |
| Sindrome da deficit di 21-idrossilasi | 1 |
| Sindrome di Pallister-Killian | 1 |
| CHARGE | 1 |
| VACTERL | 1 |
| MURCS | 1 |
| Sindrome oto-palato-digitale | 1 |
| Sindrome di Moebius | 1 |
| Hermansky-Pudlak syndrome | 1 |
| Sindrome di Coffin-Siris | 1 |
| Sindrome di Refsum | 1 |
| Sindrome di Fine-Lubinsky | 1 |
| Sindrome di Turner | 1 |
| Sindrome di Saethre-Chotzen | 1 |
| Sindrome dell'X-fragile | 1 |
| Quadri familiari di RM, associato o meno ad altre anomalie | 9 |
| Quadri di RM, associato o meno ad altre anomalie, a causa non nota | 123 |
| TOTALE | 213 |

1.2 GENETICA ONCOLOGICA

Negli anni di specialità ho effettuato inoltre consulenze di genetica oncologica, essenzialmente nell'ambito della valutazione diagnostica di sindromi tumorali familiari (Tabella 2). Alcuni degli ambiti in cui ho effettuato tali consulenze sono il retinoblastoma, il carcinoma midollare della tiroide, la sindrome del carcinoma familiare della mammella e dell'ovaio e sindromi tumorali familiari con carcinoma del colon.

Consideriamo brevemente il retinoblastoma, un tumore maligno della retina che colpisce i bambini. Esso può presentarsi in forma sporadica o familiare, ed in quest'ultimo caso è associato a mutazioni del gene *RBI*, localizzato in 13q14. È stata poi descritta una sindrome da microdelezione in tale regione, le cui caratteristiche sono retinoblastoma, dismorfismi e ritardo mentale. Questo fa ipotizzare che tra i geni fiancheggianti *RBI* vi sia un gene responsabile di ritardo mentale, ed in tal senso è stato tentato un approccio di definizione della regione critica per arrivare ad individuare il gene candidato. Il nostro gruppo ha effettuato tale approccio tramite tecnica di Array-CGH, ma occorreranno ulteriori studi per identificare tale gene⁴.

Nelle consulenze oncologiche, se la storia clinica e familiare sono inseribili in una sindrome tumorale familiare specifica, si propone l'esecuzione del test e l'individuazione delle misure di prevenzione più indicate. Nel corso della consulenza è importante che venga fornita una corretta informazione sulla storia naturale della condizione e sui pro e i contro degli strumenti disponibili per la riduzione del rischio, al fine di aiutare il paziente ad effettuare le scelte più appropriate al suo caso. In pratica i pazienti, sulla base della storia familiare e personale o al riscontro di una mutazione in uno dei geni responsabili di sindrome tumorale familiare, vengono inseriti in categorie a rischio, basso, moderato o alto, di sviluppare tumori. Ai pazienti con rischio moderato o alto vengono proposti screening specifici che consentono una diagnosi in fase precoce con migliore prognosi. Si pongono, poi, chiari dilemmi etici nel caso di test genetici predittivi, cioè nell'esecuzione del test genetico nei familiari asintomatici di un soggetto con diagnosi clinica e molecolare di malattia genetica, in questo caso di sindrome tumorale familiare. In tale ambito, entrano in gioco da un lato il principio di autonomia individuale, per cui il medico ha la responsabilità di fornire informazioni sufficienti tali da consentire all'individuo di esprimere un giudizio consapevole, indipendente e volontario su ciò che gli viene proposto, e dall'altro il principio di beneficiabilità, che implica il compito di ottimizzare i benefici di un qualsiasi intervento venga preso in considerazione. Per le chiare questioni di natura etica, medico-legale e psicologica

che entrano in gioco nella consulenza genetica oncologica, in particolare nel caso di test predittivi, vi è un generale accordo, a meno che la mutazione non predisponga a tumori che si sviluppino nell'infanzia o nell'adolescenza, sull'eseguire tali esami in soggetti maggiorenni, per garantire l'autonomia di scelta individuale.

Tabella 2 Consulenze di Genetica Oncologica

| MALATTIA | NUMERO |
|--|---------------|
| Sindromi tumorali familiari con carcinoma del colon | 11 |
| Sindrome di Lynch | 6 |
| Poliposi adenomatosa del colon | 4 |
| Sindrome di Gardner | 1 |
| Sindrome di Peutz-Jeghers | 1 |
| Sindrome tumorale familiare di mammella e ovaio | 15 |
| Carcinoma gastrico familiare | 2 |
| Carcinoma midollare della tiroide – MEN2A | 3 |
| Mesotelioma | 2 |
| Carcinoma papillare della tiroide | 2 |
| Casi isolati di tumori multipli | 3 |
| Sindrome di Von-Hippel-Lindau | 2 |
| Sindromi mielodisplastiche | 2 |
| Altri | 5 |
| Schwannoma | 1 |
| Melanoma familiare | 1 |
| Sindrome di Rendu Osler | 1 |
| Sindrome di Wilms | 1 |
| Timoma, cisti pancreatiche | 1 |
| Retinoblastoma | 1 |
| Familiarità per tumori | 2 |
| TOTALE | 50 |

1.3 MALATTIE NEUROLOGICHE DELL'ADULTO

Ho poi partecipato a consulenze genetiche riguardanti malattie neurologiche dell'adulto, in particolare la corea di Huntigton, la distrofia facioscapuloomerale, la distrofia oculofaringea e la malattia di Parkinson (Tabella 3). Queste patologie non hanno una terapia specifica e nel caso venga fatta diagnosi di una di queste patologie non vi è modo attualmente di influenzare la storia naturale della patologia. A livello internazionale sono state quindi elaborate specifiche linee guida, adottate nell'UOC Genetica Medica di Siena, per l'analisi genetica di malattie neurodegenerative ad insorgenza nell'età adulta in pazienti asintomatici, che prevede l'effettuazione di un minimo di quattro incontri, nei quali devono essere presenti il genetista e lo psicologo. Tali protocolli sono stati inizialmente creati per la corea di Huntigton, una malattia neurodegenerativa caratterizzata da disturbi psichiatrici, disordini motori e deficit cognitivi ad insorgenza tardiva ed a penetranza elevata. In questo caso, gli individui portatori dell'allele mutato possono essere asintomatici ma svilupperanno quasi sicuramente una malattia devastante per cui non vi è attualmente una terapia efficace. Ci si può, quindi, chiedere se la conoscenza dell'esito del test genetico risulti un beneficio o un danno per questi individui. La risposta non è semplice e gli studi dimostrano che alcuni individui a rischio scelgono di sottoporsi al test, altri no. In ogni caso, la decisione è strettamente personale ed effettuata dopo un percorso che prevede più incontri, in cui sono associate le figure del genetista e delle psicologo.

Tabella 3 Malattie Neurologiche dell'Adulto

| MALATTIA | NUMERO |
|---|---------------|
| Polineuropatie ereditarie (CMT/HNPP) | 19 |
| Distrofia facioscapolomerale | 15 |
| Distrofinopatie | 3 |
| Altre distrofie muscolari | 3 |
| Distrofia dei cingoli | 1 |
| Distrofia oculo-faringea | 1 |
| Miotilinopatia | 1 |
| Corea di Huntigton | 8 |
| Malattia di Parkinson | 4 |
| Paraparesi spastica | 5 |
| Altre | 4 |
| Polineuropatia | 1 |
| Neuropatia viscerale familiare | 1 |
| Sindrome coreica | 1 |
| Atassia di Fredereich | 1 |
| TOTALE | 61 |

1.4 CONSULENZE GENETICHE PRENATALI E PRECONCEZIONALI

Negli ultimi due anni di specialità ho poi partecipato attivamente a consulenze prenatali e preconcezionali (Tabella 4).

La consulenza genetica che precede l'eventuale esecuzione della diagnosi prenatale invasiva è volta a verificare che la situazione presentata dai richiedenti corrisponda a una patologia diagnosticabile in utero e che l'entità del rischio genetico effettivamente sussistente sia tale da giustificare il ricorso a una diagnosi prenatale invasiva, a informare in maniera esauriente i richiedenti circa le possibilità e i limiti, i benefici e i rischi di una diagnosi prenatale, in modo che essi possano esprimere un consenso libero ed informato all'esecuzione della medesima. L'indicazione principale ad una diagnosi prenatale è l'età materna avanzata. Infatti la gravidanza in donne con più di 35 anni è associata ad un aumento del rischio per sindrome di Down ed altre aneuploidie cromosomiche, ed in tali casi viene offerta una consulenza genetica in cui si discute dell'eventuale diagnosi prenatale invasiva. Alla consulenza genetica prenatale giungono, poi, le donne in gravidanza in cui la diagnostica non invasiva abbia evidenziato aumentato rischio di aneuploidie fetali. Inoltre, la consulenza genetica prenatale può essere effettuata a causa di specifiche indicazioni basate sulla storia familiare o perché la donna gravida e/o il partner sono portatori di malattie genetiche.

Le consulenze preconcezionali sono in genere effettuate per problemi di infertilità, e spesso si tratta di coppie in attesa di sottoporsi a tecnica di procreazione medicalmente assistita (PMA), o per poliabortività. Lo scopo di queste consulenze è valutare se alla base del quadro vi può essere una causa genetica ed in tal caso raccomandare un'analisi genetica, in particolare nei protocolli per la PMA le analisi raccomandate sono cariotipo, analisi molecolare di microdelezioni dell'Y e analisi del gene *CFTR*, responsabile di fibrosi cistica.

Tabella 3 Consulenze genetiche prenatali e preconcezionali

| MALATTIA | NUMERO |
|---|---------------|
| Consulenze preconcezionali | 51 |
| Iter procreazione medicalmente assistita | 29 |
| Infertilità | 3 |
| Poliabortività | 11 |
| Trait talassemico | 3 |
| Teratogeni in gravidanza | 2 |
| Pregressa morte fetale | 3 |
| Aneuploidie cromosomi sessuali | 6 |
| Sindrome di Klinefelter | 3 |
| Sospetta sindromi di Turner | 4 |
| Consulenze prenatali | 24 |
| EMA | 13 |
| Sindrome di Alport X-legata | 1 |
| SMAI | 1 |
| Malattia di Tay-sachs | 1 |
| Glaucoma | 1 |
| Teratogeni in gravidanza | 2 |
| Traslocazione cromosomica in padre e feto | 1 |
| Familiarità per disturbi dell'umore | 1 |
| Feto con cariotipo 47,XXY | 1 |
| Feto con cariotipo 47,XXX | 1 |
| Carcinoma papillare della tiroide nella madre | 1 |
| TOTALE | 82 |

1.5 ALTRE CONSULENZE GENETICHE

Le consulenze genetiche cui ho partecipato si sono comunque svolte in vari altri campi (Tabella 5). Infatti, mutazioni genetiche sono alla base di patologie che si possono presentare in tutti gli organi ed apparati. In tal senso, il medico genetista collabora con il medico specialista, di cui è competenza il corretto inquadramento diagnostico, per effettuare una corretta valutazione della patologia, in modo che, se disponibile, possa essere avviata la corretta indagine genetica e possa essere effettuata una valutazione diagnostica, prognostica e di rischio a livello familiare.

Tabella 5 Altre Consulenze

| MALATTIA | NUMERO |
|---|---------------|
| Nefropatie | 5 |
| Malattia cistica midollare/nefronoftisi | 1 |
| Nefropatia familiare | 1 |
| Sindrome di Senior-Loken | 1 |
| Rene policistico autosomico dominante | 1 |
| Sindrome di Gitelman | 1 |
| Malattie oculari | 8 |
| Glaucoma | 1 |
| Amaurosi Congenita di Leber | 1 |
| Sindrome Peters Plus | 1 |
| Atrofia Ottica | 1 |
| Sindrome di Coats | 1 |
| Aniridia | 1 |
| Retinoschisi X-legata | 1 |
| Retinite Pigmentosa | 1 |
| Malattie dermatologiche | 7 |
| Pachionichia Congenita | 1 |
| Epidermolisi Bollosa | 1 |
| Sindrome di De Sanctis Pacchione | 1 |
| Teleangectasia Essenziale Generalizzata | 1 |
| Ulcere Croniche | 1 |
| Ittiosi | 2 |
| Emocromatosi | 5 |
| Trombofilia/Iperomocisteinemia | 6 |
| Malattie reumatologiche | 11 |
| Sindrome di Marfan | 4 |
| S. Ehlers Danlos | 2 |
| Febbre periodica | 1 |
| Contratture Muscolari | 1 |
| Poliartrite + Leucocitosi | 1 |
| Familiarità per aneurisma | 1 |
| Sindrome di Antifosfolipidi | 1 |
| Sordità prelinguale | 3 |
| Altre | 7 |
| Lipomatosi Benigna Cervicale | 1 |
| Colangita Sclerosante Primitiva | 1 |
| Sindrome di Gorlin | 1 |
| Atrofia Intestinale 3b | 1 |
| Iposfosfatasi | 1 |
| Pancreatite Cronica | 1 |
| Deficit di 21-idrossilasi | 1 |
| TOTALE | 52 |

1.6 SINDROME DI ALPORT

Un campo di cui mi sono poi specificamente occupata durante questi anni di specialità è la Sindrome di Alport, una patologia di cui l'UOC Genetica Medica di Siena è centro di riferimento nazionale ed internazionale (Tabella 5). In questa tesi, ho scelto di parlare di questa patologia, approfondendo in particolare la forma meno nota di tale patologia, la forma a trasmissione autosomica dominante, e la rara forma di sindrome di Alport X-legata associata a Leiomiomatosi diffusa.

Tabella 5 Consulenze per Sindrome di Alport

| MALATTIA | NUMERO |
|---|---------------|
| ATS X-legata | 40 |
| Diagnosi clinica, analisi molecolare positiva | 8 |
| Diagnosi clinica, analisi molecolare negativa | 6 |
| Sospetto clinico, analisi molecolare negativa | 6 |
| Diagnosi clinica, analisi molecolare in corso | 20 |
| ATS AUTOSOMICA RECESSIVA | 7 |
| Diagnosi clinica, analisi molecolare positiva | 2 |
| Diagnosi clinica, analisi molecolare in corso | 5 |
| ATS AUTOSOMICA DOMINANTE TBMN | 23 |
| Diagnosi clinica, analisi molecolare positiva | 3 |
| Diagnosi clinica, analisi molecolare in corso | 21 |
| ATS-DL | 1 |
| TOTALE | 70 |

2 LA SINDROME DI ALPORT

La sindrome di Alport (ATS) è una nefropatia ereditaria progressiva, eterogenea sia dal punto di vista clinico che genetico. Si tratta di una nefropatia ematurica caratterizzata da alterazioni ultrastrutturali della membrana basale glomerulare (MBG), talvolta accompagnata da ipoacusia neurosensoriale per le alte frequenze e/o lesioni oculari, quali maculopatia e lenticono anteriore⁵.

La diagnosi clinica di ATS in un paziente con ematuria od insufficienza renale, viene effettuata quando sono presenti almeno tre dei quattro seguenti criteri: i) storia familiare positiva per ematuria o insufficienza renale cronica (IRC); ii) studio ultrastrutturale della biopsia renale che mostri le tipiche alterazioni della membrana basale glomerulare (assottigliamento, ispessimento e slaminamento); iii) anomalie oculari tipiche (lenticono, chiazze retiniche perifoveali); iv) ipoacusia neurosensoriale bilaterale per le alte frequenze⁶.

La ATS è considerata una delle più frequenti nefropatie ereditarie ed ha un'incidenza stimata intorno a 1/5000. Si calcola che sia responsabile di circa l'1-2% dei casi di insufficienza renale in Europa e che interessi il 2-3% dei pazienti che subiscono trapianti renali negli Stati Uniti^{7,8}. La malattia è causata da alterazioni del network delle catene $\alpha 3$, $\alpha 4$ ed $\alpha 5$ del collagene tipo IV nella MBG⁹. Queste catene sono codificate da 3 geni: *COL4A3* e *COL4A4*, localizzati testa a testa sul cromosoma 2, e *COL4A5* localizzato sul cromosoma X testa a testa con il *COL4A6*, gene che codifica per una catena non espressa nella MBG, la catena $\alpha 6(IV)$.

Secondo le conoscenze attuali, la ATS X-legata (XL-ATS, OMIM 301050) è la forma più comune di ATS (circa 85% dei casi) ed è causata da mutazioni nel gene *COL4A5*¹⁰⁻¹². L'ereditarietà di questa forma viene definita come semi-dominante, in quanto i maschi presentano un coinvolgimento clinico più severo delle femmine. I maschi sono affetti da ATS e presentano insufficienza renale terminale in età giovanile, nel 70% dei casi prima dei 30 anni, spesso associata a sintomi extra-renali¹³. Le femmine sono portatrici e solitamente presentano solo microematuria, la progressione in insufficienza renale è rara e di solito avviene in età più avanzata⁵.

Esistono inoltre altre due forme di ATS, entrambe legate ai geni *COL4A4* e *COL4A3*. L'ATS a trasmissione autosomica recessiva (AR-ATS, OMIM 203780) è caratterizzata da una rapida progressione in insufficienza renale, sia nei maschi che nelle femmine, in genere associata a sintomi extra-renali¹⁴. L'ATS a trasmissione autosomica dominante (AD-ATS, OMIM 104200) è caratterizzata, sia nei maschi che nelle femmine, da una lenta progressione

in insufficienza renale e bassa incidenza di sintomi extra-renali¹⁵. Mutazioni in eterozigosi dei geni *COL4A4* e *COL43* sono responsabili non solo di ADAS, ma anche del 40% dei casi di microematuria familiare benigna (BFH, OMIM 141200) o nefropatia delle membrane sottili (TBMN)¹⁶.

Raramente, l'ATS è associata a leiomiomatosi diffusa (DL), un'ipertrofia benigna del muscolo liscio viscerale a livello del tratto gastrointestinale, respiratorio e dell'apparato genitale femminile¹⁷. I pazienti con ATS-DL presentano un delezione che comprende la porzione 5'terminale dei geni *COL4A5* e *COL4A6* e la regione intra-genica, con punto di rottura prossimale localizzato nell'introne 2 del *COL4A6*¹⁷⁻²⁰.

2.1 PANORAMICA STORICA

La ATS è stata descritta per la prima volta nel 1927²¹. Alport pose l'attenzione su una famiglia descritta da Guthrie nel 1902 nella quale 12 su 15 membri di due generazioni sia maschi che femmine avevano una nefropatia con sordità. Alport sottolineava la differenza nella gravità del coinvolgimento renale tra i maschi e le femmine. Per lungo tempo, il tipo di trasmissione della ATS è stata dibattuta e l'ATS è stata considerata una malattia autosomica dominante dove le femmine erano meno affette dei maschi e si riproducevano più spesso. Le proporzioni riportate di maschi affetti nati da un padre affetto erano di 83% sani contro 17% affetti²². Oggi possiamo a posteriori interpretare lo sbilanciamento dei rapporti a favore dei figli sani con il fatto che la forma più comune di ATS è la forma X-legata in cui il 100% dei figli maschi di un padre affetto sono sani. Nel 1988 è stato identificato, mediante studi di linkage, il locus maggiore sul cromosoma X e, nel 1990 si è giunti ad identificare il gene *COL4A5*, localizzato in Xq22.3, come responsabile di ATS^{8,23}. Tale gene è responsabile della forma più comune di questa malattia, la sindrome di Alport legata al cromosoma X (OMIM#301050). La trasmissione X-legata non poteva però spiegare tutti i casi di ATS infatti erano note famiglie in cui si aveva una trasmissione maschio-maschio e/o manifestazioni cliniche simili in maschi e femmine, per cui si è continuato a cercare altri locus ed altri geni responsabili di ATS.

Nel 1993 sono stata individuate mutazioni a carico del gene *COL4A4*, localizzato sul cromosoma 2, in pazienti affetti dalla meno comune forma autosomica recessiva²⁴. Successivamente, in pazienti con AR-ATS, sono state individuate mutazioni sia nel gene *COL4A3* che nel gene *COL4A4*, localizzati testa a testa sul cromosoma 2²⁵. I pazienti con AR-ATS presentano due mutazioni in omozigosi o in eterozigosi composta in uno dei due geni, e presentano una patologia con coinvolgimento renale severo, sia nei maschi che nelle femmine. Gli individui eterozigoti possono essere completamente asintomatici o presentare microematuria^{24,26}. Nel 1996 è stata riportata una famiglia con ATS-AR in cui nel ramo paterno segregava una BFH o TBMN, e tutti e 9 i soggetti con TBMN erano eterozigoti per una mutazione a carico del gene *COL4A4*²⁷. Tale lavoro suggeriva che i soggetti affetti da TBMN potessero essere dei portatori dell'ATS-AR. La conferma è arrivata nel 1998, quando è stata descritta una famiglia con AR-ATS in cui una mutazione del gene *COL4A4* in eterozigosi segregava con microematuria ed assottigliamento della membrana basale²⁸. Infine nel 2001 è stata riportata per la prima volta una famiglia in cui la TBMD era associata ad una mutazione in eterozigosi nel gene *COL4A4*, ma nessun membro della famiglia mostrava ATS-

AR o ATS-XL²⁹. Si trattava della stessa mutazione riportata nel 1996 in eterozigosi composta, in una famiglia con ATS-AR ed in cui in un ramo della famiglia segregava una TBMN. Successivamente è stato dimostrato che anche mutazioni nel gene *COL4A3* sono responsabili di TBMD¹⁶.

L'esistenza di una forma autosomica dominante della sindrome di Alport (ATS-AD) è stata ipotizzata per la prima volta nel 1976 e descritta nel 1985, ma è stata a lungo dibattuta^{22,30}. Solo nel 2000 si è avuta la conferma molecolare, quando è stata descritta una famiglia con ATS-AD in cui negli individui affetti era presente una mutazione in eterozigosi del gene *COL4A3*³¹. Successivamente, sono state descritte altre famiglie con diagnosi clinica e molecolare di AD-ATS, e tale patologia è stata definitivamente associata a mutazioni in eterozigosi dei geni *COL4A3* e *COL4A4*^{32,14,15}.

2.2 PATOGENESI

L'ATS è causata da mutazioni nei geni che codificano per le catene del collagene di tipo IV ed una comprensione di tali molecole aiuta a spiegare la patogenesi di tale patologia³³. Il collagene di tipo IV è il principale componente proteico delle lamine basali, dove assieme a proteoglicani e laminina forma un sottile strato specializzato della matrice extracellulare. La lamina basale si trova interposta tra le cellule epiteliali ed il tessuto connettivo sottostante, anche se nel glomerulo renale e nell'alveolo polmonare è interposta tra i due strati cellulari, epiteliale ed endoteliale. In questi organi la lamina basale svolge la funzione di filtro molto selettivo³⁴.

Le catene del collagene di tipo IV sono dette catene α . Nell'uomo sono stati identificate 6 catene per il collagene di tipo IV, codificate da 6 geni differenti. I geni che codificano per le catene $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (*COL4A1* e *COL4A2*) sono localizzati sul cromosoma 13, nella regione 13q34³⁵. I geni codificanti per le catene $\alpha 3$ e $\alpha 4$ (*COL4A3* e *COL4A4*) sono localizzati sul cromosoma 2, banda q35³⁶. Infine i geni *COL4A5* e *COL4A6*, che codificano rispettivamente per le catene $\alpha 5$ e $\alpha 6$, sono localizzati sul braccio lungo del cromosoma X nella regione Xq22^{23,37,38}. I geni di ogni coppia sono disposti testa a testa e vengono trascritti da un promotore comune³⁹. Questa tipica disposizione dei geni e la somiglianza tra le sequenze codificanti, hanno fatto presupporre che un gene ancestrale si sia duplicato dando origine ad una coppia di geni ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) dalla quale sarebbero derivate altre duplicazioni su cromosomi diversi^{34,37}.

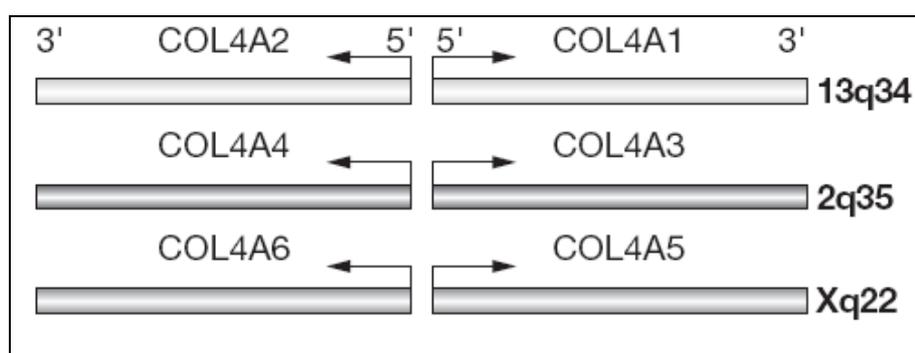


Figura 1. Rappresentazione schematica dei geni del collagene di tipo IV (modificata da Gubler MC, 2008)

I geni che codificano per le catene $\alpha 1$ (IV) e $\alpha 2$ (IV) sono localizzati in una disposizione testa a testa sul cromosoma 13q34. I geni codificanti per le catene $\alpha 3$ (IV) e $\alpha 4$ (IV) si trovano sul cromosoma 2q35 e quelli che codificano per le catene $\alpha 5$ (IV) e $\alpha 6$ (IV) sono sul cromosoma Xq22.

Le catene α del collagene di tipo IV sono caratterizzate da tre distinti domini²⁸:

- 7S, ovvero dominio collagenico minore a tripla elica posto all'estremità N-terminale (circa 230 residui amminoacidici)
- Dominio collagenico maggiore a tripla elica posto nella porzione centrale della catena, con la tipica sequenza amminoacidica Gly-X-Y (circa 1400 residui amminoacidici)
- NC, dominio non collagenico globulare localizzato nella regione C-terminale stabilizzato da ponti disolfuro (circa 230 residui amminoacidici)

Il dominio collagenico è caratterizzato dalla tipica sequenza amminoacidica ripetuta Gly-X-Y che mantiene la conformazione della tripla elica, dove ad ogni glicina seguono due amminoacidi X e Y che sono frequentemente residui di prolina. Molte delle proline sono idrossilate in seguito a modificazioni post-traduzionali. La prolina e l'idrossiprolina formando legami disolfuro con le altre due catene e ciò conferisce stabilità, rigidità e la capacità di ripiegarsi per formare la tripla elica. La glicina si adatta perfettamente all'interno dell'elica e ognuno di questi residui trovandosi in stretta vicinanza con le altre due catene, le stabilizza con legami idrogeno. Nel collagene di tipo IV le sequenze Gly-X-Y vengono interrotte, a intervalli di circa 20 triplette, dando luogo a segmenti che non assumono più una conformazione a elica. Le interruzioni conferiscono alla molecola maggiore flessibilità e sensibilità alla proteolisi rispetto ai collageni I,II,III.

Le 6 diverse catene α possono essere classificate in due gruppi strutturali:

- Gruppo $\alpha 1$ -like, comprende le catene $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$
- Gruppo $\alpha 2$ -like, comprende le catene $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 6$.

Le due classi si differenziano per il numero di esoni che codificano per il dominio NC, rispettivamente 5 per il gruppo $\alpha 1$ -like e 3 per il gruppo $\alpha 2$ -like^{37,10}.

Tre catene polipeptidiche avvolte ad elica formano il protomero e nel collagene di tipo IV sono possibili solo 3 protomeri, dati dalle seguenti 3 combinazioni delle 6 differenti catene: $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ e $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$. I protomeri, sintetizzati nelle cellule del tessuto connettivo, vengono poi secreti ed interagiscono tra loro formando un intreccio piano pluristratificato piuttosto che un reticolo di fibrille. E' stato proposto un modello di assemblamento per l'organizzazione del collagene di tipo IV in cui 4 molecole sono connesse attraverso il dominio 7S mediante ponti disolfuro e 2 molecole possono interagire testa a testa attraverso il dominio globulare NC, formando delle maglie molecolari che costituiscono la struttura portante della membrana basale⁴⁰. L'associazione delle molecole resta stabile attraverso ponti disolfuro intramolecolari tra le estremità N-terminale e C-terminale (figura 1).

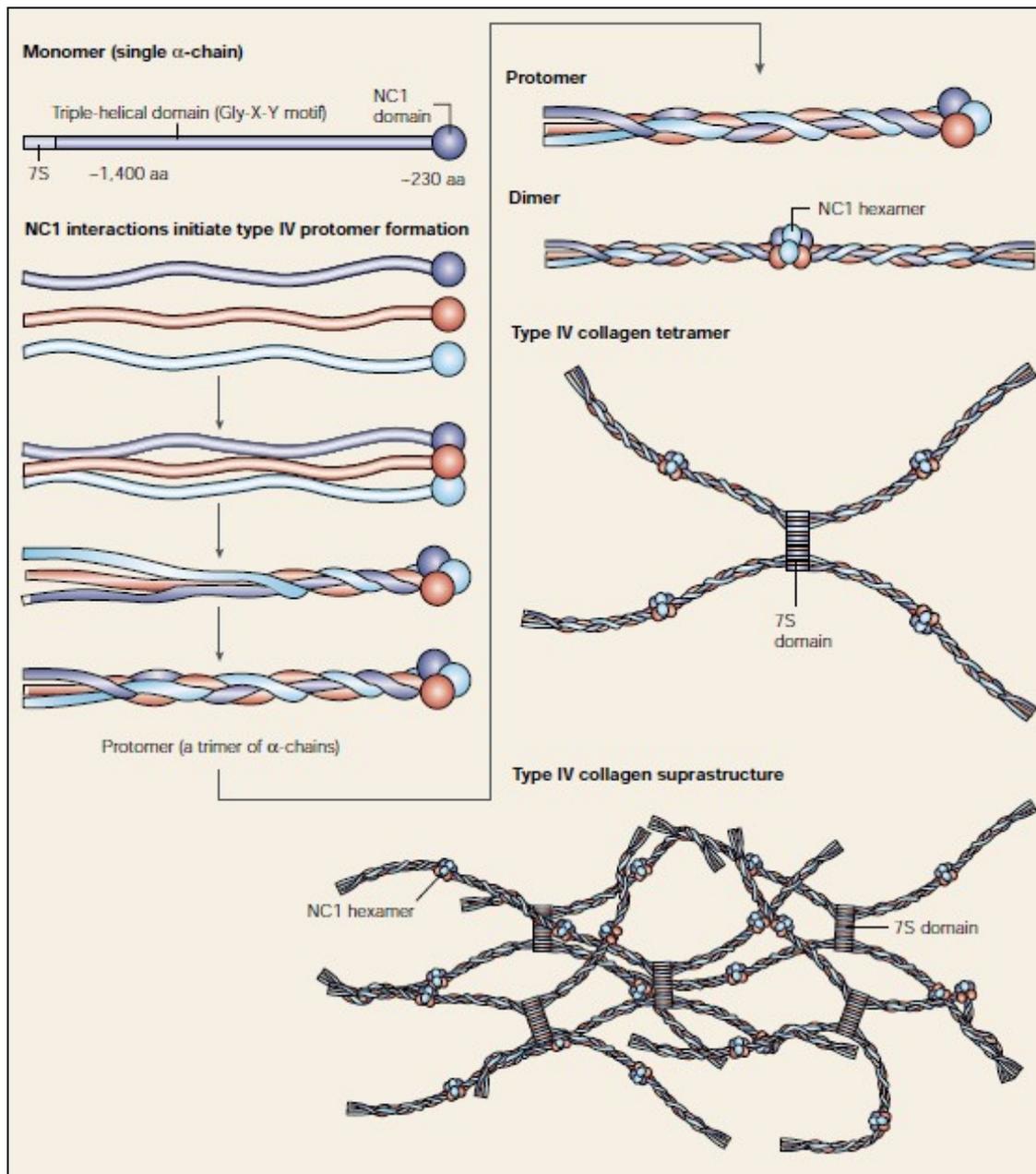


Figura 2: struttura del collagene di tipo IV (tratta da Kalluri R, 2003)

Struttura della catena α ed assemblamento dal protomero alla formazione del network

I tetrametri, quindi, interagiscono a formare strutture sovramolecolari dette network. Solo tre tipi di network sono possibili per il collagene di tipo IV:

- $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$: ubiquitario
- $\alpha 3(\text{IV})/\alpha 4(\text{IV})/\alpha 5(\text{IV})$: predominante nella MBG e nelle lamine basali di occhio ed orecchio
- $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})/\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$: presente nella capsula di Bowman, nella lamine basali subepiteliali e della muscolatura liscia

La scelta del tipo di catena α per l'assemblamento dei protomeri e del network è regolata da specifiche sequenze di riconoscimento presenti nella regione ipervariabile del dominio NC⁹.

L'assenza del network $\alpha3/\alpha4/\alpha5$ nei pazienti con sindrome di Alport causa l'alterazione della GMB e il progressivo deterioramento della funzionalità renale.

Il dominio NC della catena $\alpha3$ del collagene di tipo IV presente nella GMB è stato riconosciuto come il principale bersaglio dagli anticorpi nei pazienti affetti dalla sindrome di Goodpasture, malattia autoimmune che causa emorragie polmonari e renali^{41,42}.

2.3 QUADRO CLINICO

L'ATS è essenzialmente una nefropatia, che si associa eventualmente ad ipoacusia e anomalie oculari. Il decorso clinico di questa patologia è caratterizzato da un lento e progressivo decadimento della funzione renale, sino all'insufficienza renale cronica, che necessita nella fase terminale del trattamento sostitutivo. Anche se è difficile fare una chiara valutazione sull'andamento clinico nel singolo paziente con ATS, sono considerati fattori prognostici sfavorevoli la presenza di sordità progressiva fin dall'infanzia, di proteinuria elevata di tipo nefrosico, di lesioni oculari diffuse, di alterazioni della membrana basale con interessamento di molti glomeruli e di scleroialinosi⁴².

La caratteristica clinica principale della ATS è la microematuria⁴¹. Può essere presente anche macroematuria, caratterizzata da episodi di sangue rosso nelle urine o di urine color coca cola. La macroematuria è più frequente nell'infanzia ed è esacerbata dall'esercizio fisico o da comuni infezioni delle vie aeree superiori⁴². La microematuria è spesso associata a proteinuria che in genere si aggrava negli anni e, come abbiamo detto, una proteinuria elevata o il progressivo aumento della proteinuria sono un indice prognostico sfavorevole. La nefropatia poi assume caratteristiche simili a quelle di altre glomerulopatie e si assiste alla comparsa di ipertensione ed insufficienza renale⁴².

La principale manifestazione clinica extra-renale è l'ipoacusia neurosensoriale per le alte frequenze, che può progressivamente aggravarsi fino a richiedere l'ausilio protesico⁴².

Le manifestazioni oculari, come già detto, sono in genere presenti in pazienti con una forma severa di ATS, che presentano insufficienza renale ed ipoacusia ad esordio precoce⁴³. L'anomalia oculare più frequente ma aspecifica è una retinopatia caratterizzata da lesioni pigmentate maculari e perimaculari, in genere associate ad aree di depigmentazione⁴⁴. Un'anomalia oculare specifica è, invece, il lenticono bilaterale anteriore, più raramente posteriore. Per lenticono si intende la protrusione conica o sferica della superficie del cristallino ed il deficit visivo ad esso correlato non è correggibile con lenti⁴⁵. Può complicarsi con la rottura spontanea della capsula del cristallino, che porta all'estrusione del contenuto e a cataratta precoce. Nei pazienti con ATS vengono, inoltre, riportati arco corneale giovanile, distrofia corneale polimorfa posteriore bilaterale e lesioni corneali ricorrenti^{45,46}. L'ATS è, inoltre, associata con un'augmentata incidenza di errori rifrattivi, in particolare miopia⁴⁵.

La diagnosi clinica di ATS si avvale della **biopsia renale**, con analisi al microscopio elettronico ed analisi immunoistochimica delle catene del collagene di tipo IV.

L'analisi al microscopio elettronico della biopsia renale nella ATS evidenzia anomalie tipiche della MBG, che sono rappresentate da spessore variabile, in quanto si riscontrano aree di ispessimento alternate ad aree di assottigliamento, slaminamenti ed interruzioni (Figura 3). La MBG può inoltre presentare depositi e margini, esterno ed interno, irregolari con aspetto detto a "basket weave"^{47,48}. Non tutti gli individui con ATS, comunque, presentano tutte queste caratteristiche (ad esempio in fase iniziale può essere presente solo un assottigliamento della membrana basale)⁴⁷. Inoltre, in alcuni pazienti con malattie glomerulari croniche può essere notato uno spessore variabile ed un contorno irregolare della MBG⁴⁸.

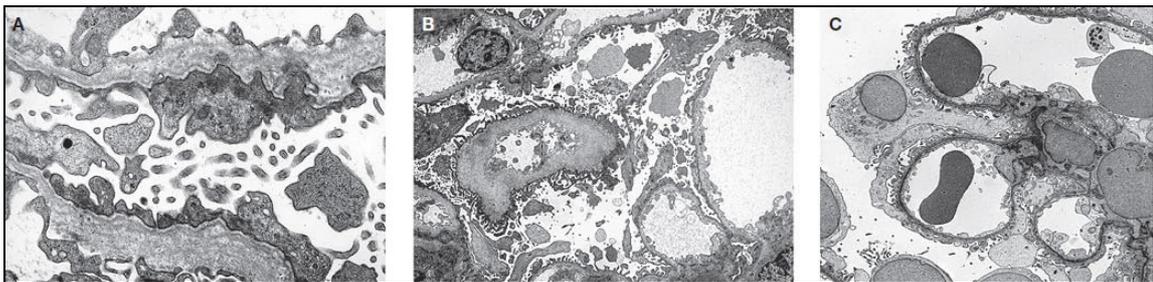


Figura 3 Microscopia elettronica della biopsia renale nella ATS (modificata da Gubler MC, 2008)
 (A) Ispessimento e rottura della MBG, che presenta margini "festonati" (pz di 11 aa; x30000x) (B) Irregolare ispessimento della MBG (pz di 12 aa; x5400) (C) Diffuso assottigliamento della MBG (pz di 3 aa; x6200).

L'affidabilità della diagnosi dell'ATS tramite biopsia renale nell'ultimo decennio è stata aumentata associando allo studio ultrastrutturale la valutazione dell'espressione delle catene del collagene di tipo IV tramite immunofluorescenza⁴⁸. Nella biopsia renale, viene in genere valutata l'espressione della catena $\alpha 1(\text{IV})$, utilizzata come controllo, e delle catene $\alpha 3(\text{IV})$ ed $\alpha 5(\text{IV})$. Le femmine portatrici di XL-ATS mostrano un'espressione discontinua o a mosaico delle catene $\alpha 3(\text{IV})$ e $\alpha 5(\text{IV})$. I maschi con XL-ATS mostrano una completa assenza dell'espressione di tali catene nella MBG, come pure i pazienti con AR-ATS. Nei pazienti con AR-ATS, l'espressione della catena $\alpha 5(\text{IV})$ è mantenuta nella capsula di Bowman. Nell'AD-ATS l'espressione delle catene del collagene tipo IV può essere discontinua o normale. In genere, l'espressione delle catene del collagene di tipo IV è normale nella TBMN⁴⁹.

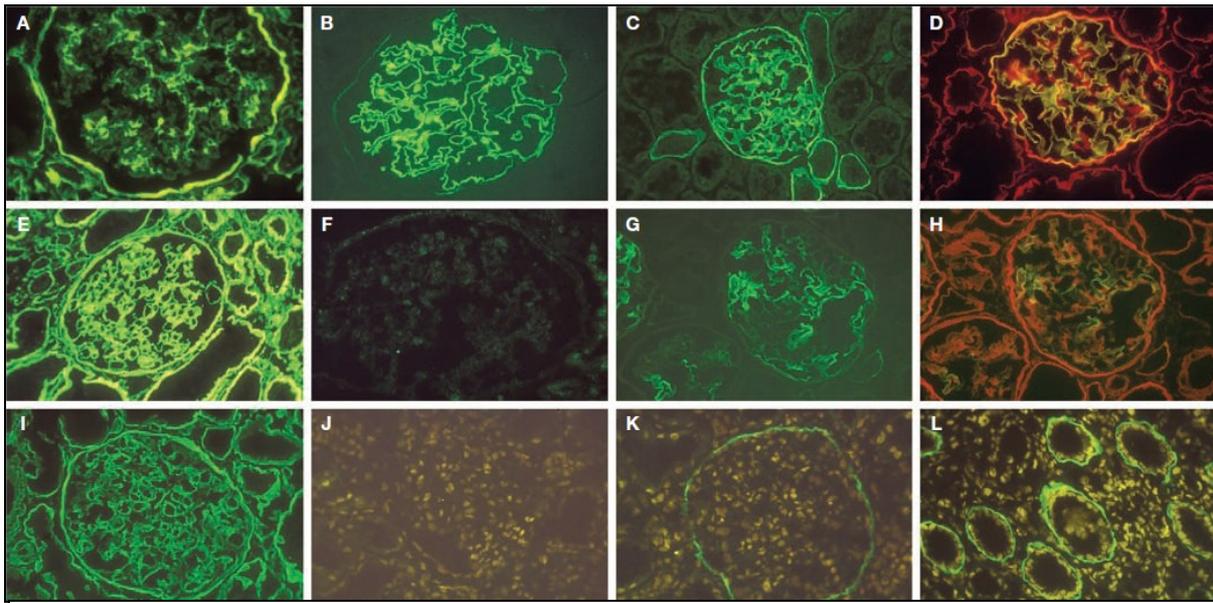


Figura 4 Analisi immunohistochimica per catene $\alpha(IV)$ su biopsia renale (modificato da Guble, 2008)
 (A–D) controllo (E,F) maschio con XL-ATS (G,H) femmina con XL-ATS (I–L) soggetto con AR-ATS.
 (A,E,I) colorazione con anticorpi anti $\alpha1(IV)$ (B,F,J) anticorpi anti $\alpha3(IV)$, (C,G,K,L) anticorpi anti $\alpha5(IV)$ (D,H) doppia colorazione con anticorpi anti- $\alpha2(IV)$ in rosso e anti- $\alpha5(IV)$ in verde.
 Controllo: (A) la catena $\alpha1(IV)$ è presente nella matrice mesangiale, nella capsula di Bowman e nella membrane basale extra-glomerulare (B) la catena $\alpha3(IV)$ è presente solo nella GBM (C) la catena $\alpha5(IV)$ è presente nella GBM e nella capsula di Bowman
 Maschio con XL-ATS: (E) catena $\alpha1(IV)$ normalmente espressa (F) assenza di espressione della catena $\alpha3(IV)$
 Femmina con XL-ATS: (G,H) distribuzione discontinua della catena $\alpha5(IV)$
 Soggetto con AR-ATS: (I) catena $\alpha1(IV)$ normalmente espressa (J) assenza di espressione della catena $\alpha3(IV)$ (K, L) espressione della catena $\alpha5(IV)$ assente in GBM ma presente in capsula di Bowman (K) e nelle membrane basali dei dotti collettori (L)

L' introduzione nella pratica clinica dello studio delle catene del collagene di tipo IV SU biopsia cutanea, dove viene valutata l'espressione delle catene $\alpha1(IV)$ and $\alpha5(IV)$, ha rappresentato un utile strumento, sia per la diagnosi di ATS che per aiutare a distinguere tra forma X-legata e forme autosomiche (Figura 5)⁵⁰. Fisiologicamente, a livello cutaneo viene espressa la catena $\alpha5(IV)$, ma non le catene $\alpha3(IV)$ e $\alpha4(IV)$. Quindi un'alterata espressione della catena $\alpha5(IV)$ a livello cutaneo orienta verso una XL-ATS. Il limite di tale tecnica è la percentuale di falsi negativi, che a seconda degli studi, varia tra il 30 ed il 55%⁴⁹. La sensibilità è bassa soprattutto nelle femmine, in cui ci si aspetta un pattern di distribuzione delle catene $\alpha5(IV)$ segmentale. Recentemente, comunque, la sensibilità di tale tecnica è stata aumentata grazie all'utilizzo della microscopia confocale, che consente una ricostruzione tridimensionale della sezione di tessuto esaminato in immunohistochimica e, quindi, una migliore capacità di individuare un eventuale pattern di distribuzione segmentale delle catene $\alpha5(IV)$ ⁵¹.

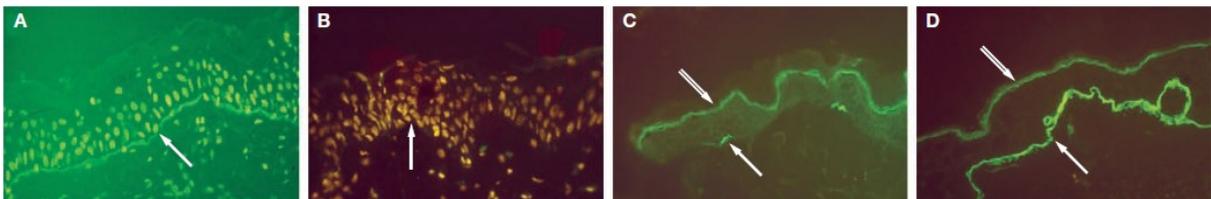


Figura 5 Analisi immunoistochimica per catene $\alpha 5(IV)$ su biopsia cutanea (modificato da Guble, 2008)

assente nella membrane basale epiteliale (freccia) (C) femmina con XL-ATS: la catena $\alpha 5(IV)$ presenta una distribuzione segmentaria nella membrane basale epiteliale (singola freccia) e vi è una colorazione non specifica dello strato cheratinico (doppia freccia) (D) soggetto con AR-ATS. Normale distribuzione della catena $\alpha 5(IV)$ nella membrane basale epiteliale (singola freccia) e vi è una colorazione non specifica dello strato cheratinico (doppia freccia)

2.4 ASPETTI TERAPEUTICI

La **terapia** nella ATS è essenzialmente **sintomatica**. Non esiste alcuna terapia specifica per questa malattia ed ai pazienti con diagnosi di ATS viene proposto uno stretto controllo nefrologico, audiometrico e oftalmologico. In questi pazienti, il problema principale è la nefropatia, per cui viene valutata nel tempo la comparsa o il peggioramento di sintomi indicativi di un deterioramento della funzionalità renale, quali ipertensione, proteinuria, diminuzione della clearance della creatinina o aumento della creatinemia. In tal caso, vengono messi in atto presidi terapeutici sintomatici, farmacologici o dietetici, per tentare di rallentare la progressione in insufficienza renale terminale. Ad oggi, comunque, il trattamento emodialitico e il trapianto renale sono i due migliori rimedi. In letteratura, nei pazienti con ATS sottoposti a trapianto renale viene riportata un'aumentata perdita del rene trapiantato per la comparsa di una nefrite anti-MBG. Attualmente, però, in seguito alla comprensione di tale patologia e al corretto uso dei farmaci immunosoppressivi, il successo del trapianto renale in un paziente con ATS è simile a quello del trapianto effettuato per altre nefropatia³³. Infatti, nella forma X legata di ATS, la comparsa di una glomerulonefrite da anticorpi anti-MBG nel primo anno post-trapianto è stata osservata nel 3-4% dei pazienti maschi trapiantati⁴². Nel 75% dei casi, ciò comporta un rapido peggioramento della funzione renale. In questi casi sono consigliabili l'uso della plasmaferesi e la somministrazione di ciclofosfamide⁴². Quindi, la perdita del rene trapiantato per la glomerulonefrite da anticorpi anti-MBG attualmente è inferiore al 3%. Nei maschi con forma X-legata di ATS, è poi dibattuto il problema dell'accettazione del trapianto di un rene da un donatore vivente consanguineo di sesso femminile eterozigote per mutazioni del gene *COL4A5* e asintomatico. In questi casi è difficile la comparsa di Ab anti-MBG, tuttavia è da tenere presente che la donatrice può sviluppare in futuro ATS. In genere, quindi, si evita tale pratica.

La **terapia farmacologia** viene utilizzata allo scopo di rallentare la progressione della nefropatia. Anche se non ci sono chiare linee guida sul come trattare i pazienti con ATS, studi condotti in vari paesi hanno evidenziato che è pratica comune in pazienti che presentano microematuria e proteinuria, senza altri sintomi di deterioramento della funzionalità renale, l'utilizzo di ACE inibitori e ARBs (essenzialmente sartani), da soli o in associazione⁵². Tali farmaci si sono in effetti dimostrati efficaci nel rallentare la progressione della patologia nei modelli animali di ATS, in particolare nel modello murino di AR-ATS e nel modello canino di XL-ATS⁵². Nei modelli murini vengono utilizzati anche in caso di sola microematuria e vi

sono evidenze che già in tale stadio tale terapia farmacologica avrebbe effetto nel rallentare la progressione della patologia^{53,54}.

Altri farmaci sono stati studiati nei modelli animali (ciclosporina, anticorpi anti TGF β 1, inibitori delle metalloproteasi di matrice, inibitori della vasopeptidasi, bloccanti del recettore delle chemochine tipo 1, inibitori della HMG-CoA redattasi e BMP7) ed hanno dato qualche evidenza di efficacia⁵². Tra questi la ciclosporina è uno dei pochi farmaci già utilizzato nella pratica clinica in altri campi. Tale farmaco nel modello canino di XL-ATS ha mostrato efficace nel rallentare le alterazioni strutturali della MBG e la progressione in insufficienza renale⁵². In alcuni centri viene utilizzata nei pazienti con ATS, ma data la potenziale nefrotossicità di tale farmaco, il suo utilizzo è ancora discusso.

La **terapia genica** rappresenta una prospettiva per il futuro, visto che da un punto di vista teorico l'ATS rappresenta un buon modello per tale applicazione. Infatti, la terapia genetica potrebbe essere specificamente indirizzata a livello renale, che presenta un sistema circolatorio isolato. Inoltre, la patologia dipende dall'anomala produzione, quantitativa o qualitativa, di una proteina secreta, e tale proteina ha un turn-over relativamente lento. L'introduzione dall'esterno di tale proteina o di cellule che producono una proteina funzionale potrebbe, quindi, portare alla remissione della sintomatologia. Infine, nelle femmine con XL-ATS, la coesistenza di proteina anomala e normale è associata ad un fenotipo lieve, per cui anche il parziale recupero della forma funzionale potrebbe rappresentare un buon ausilio terapeutico. Negli ultimi 10 anni sono stati presentati alcuni studi sulla terapia genica della ATS in modelli animali, che hanno utilizzato due tipi di approccio: vettori adenovirali e cellule staminali⁵⁵⁻⁵⁹. Gli studi con vettori adenovirali, effettuati nei modelli animali di XL-ATS, hanno valutato la possibilità della terapia genica con sostituzione della proteina o introduzione della proteina dall'esterno. Tali studi hanno portato ad alcuni risultati in termini di espressione delle catene α del collagene di tipo IV, ma rimane da valutare ciò possa portare ad un reale beneficio in termini di funzionalità renale^{55,56}. Successivamente, sono stati riportati significativi miglioramenti nel decorso della malattia nel modello murino con forma AR di ATS con l'utilizzo della terapia con cellule staminali⁵⁷⁻⁵⁹. Nel 2006, due studi hanno evidenziato che il trapianto di midollo osseo nel midollo murino di ATS portava a parziale recupero del fenotipo^{57, 58}. In questi studi, i topi *COL4A3*^{-/-}, che presentano una nefropatia equiparabile alla AR-ATS, sono stati irradiati e sottoposti a trapianto di midollo con cellule derivanti da topi wild-type. L'esito sperimentale è che le cellule derivate dal midollo trapiantato vegono in parte reclutate dai glomeruli danneggiati, dove si differenziano in cellule epiteliali (podociti) e mesangiali, cellule che producono le catene del collagene di tipo IV. A

livello sperimentale, si nota da un lato il parziale recupero dell'espressione della catena $\alpha 3$ e l'emergere dell'espressione delle catene $\alpha 4$ e $\alpha 5$, con miglioramento dell'architettura glomerulare, dall'altro una significativa riduzione della proteinuria ed il miglioramento nell'istologia globale del rene comparata con topi *COL4A3*^{-/-} non trattati o con topi irradiati e trapiantati con cellule derivanti da topi *COL4A3*^{-/-}. Questo studi sembrano, quindi, indicare che le cellule staminali derivanti dal midollo potrebbero rappresentare una strategia attuabile per il riparo dei difetti della MBG e conferire un beneficio terapeutico ai pazienti con ATS^{57,58}. Studi che hanno utilizzato l'introduzione nei topi di cellule stromali mesenchimali totipotenti, sulla base dell'ipotesi che la successiva differenziazione in cellule epiteliali e mesangiali glomerulari avrebbe portato agli stessi risultati del trapianto di midollo, non hanno portato ad alcun risultato⁶⁰. Vi è stato, poi, uno studio che avrebbe ridimensionato i risultati ottenuti e che indicherebbe che il miglioramento dell'istologia renale potrebbe anche essere in parte correlato all'irradiazione che precede il trapianto di midollo⁶¹. Tali risultati sembravano in parte contrastare i primi risultati ottenuti, fino a quando un recente articolo ha mostrato la terapia cellulare effettuata utilizzando tessuti diversi (midollo osseo, sangue o cellule staminali embrionali indifferenziate) senza irradiazione preventiva è in grado di contrastare gli effetti della nefropatia ATS-correlata⁵⁹. Il fatto che tali tecniche non richiedono irradiazione preventiva è positivo perché ciò precluderebbe la terapia ad una parte dei pazienti, ed ha come lato negativo il fatto che le cellule non colonizzano permanentemente il midollo osseo, per cui occorre una terapia continuativa. Gli autori hanno evidenziato come nei topi *COL4A3*^{-/-} l'infusione di cellule del midollo osseo wild type ha dato effetti positivi in termini di recupero della fisiologica architettura glomerulare, del network $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ e della funzionalità renale⁵⁹. Risultati positivi in tal senso si sono avuti anche con la trasfusioni di sangue ottenuto da topi wild type⁵⁹. Infine, l'infusione di cellule staminali embrionali wild type indifferenziate, ma non di quelle differenziate, ha portato a risultati in termini di recupero della fisiologia renale⁵⁹. L'utilizzo di cellule staminali indifferenziate può comunque portare allo sviluppo di teratoma⁶². Questi studi nel complesso evidenziano come le cellule derivante da topi wild type sembrano restaurare parzialmente l'architettura glomerulare in quanto attratte nel glomerulo danneggiato, ma ciò non avviene se le cellule sono parzialmente differenziate. La modalità con cui avviene non è chiara ed occorreranno ulteriori studi per chiarire ciò.

In conclusione, attualmente i pazienti con diagnosi di ATS vengono trattati con farmaci nefroprotettori quando la proteinuria diventa significativa, e la terapia dell'ATS ad oggi è rappresentata essenzialmente da trattamento emodialitico e trapianto.

2.5 LA SINDROME DI ALPORT LEGATA AL CROMOSOMA X

La sindrome di Alport legata al cromosoma X (XL-ATS) è la forma più comune e rappresenta circa 75% dei casi di ATS⁴³. L'XL-ATS è dovuta a mutazioni nel gene *COL4A5* (Xq22.3). Questo gene comprende 257 kb di DNA genomico e contiene 51 esoni. Esso codifica per un trascritto di circa 6.5 kb, con l'esone 41 alternativamente trascritto. La catena proteica $\alpha 5$ è costituita da 1685 aminoacidi⁶³.

L'ereditarietà di questa forma viene definita come semi-dominante, poiché i maschi in quanto emizigoti sono più gravemente affetti rispetto alle femmine eterozigoti^{13, 64, 65}. Il 70% dei maschi affetti raggiunge l'insufficienza renale terminale (ESRD) prima dei 30 anni di età (forma giovanile), mentre il restante 30% progredisce fino all'insufficienza renale dopo i 30 anni (forma adulta rara)¹³. Le femmine solitamente presentano solo microematuria⁵. Da un punto di vista clinico, comunque, la ATS-XL è estremamente eterogenea, mostra un'ampia variabilità nella progressione verso l'insufficienza renale terminale e importanti differenze per quanto riguarda la sintomatologia extrarenale (presenza o assenza di ipoacusia e/o di anomalie oculari). Parallelamente a questa variabilità clinica si osserva anche una notevole variabilità a livello microscopico delle lesioni della MBG.

La storia naturale della forma X-legata di ATS è ben nota grazie al fatto che negli anni '90 è stata istituita una Concerted Action sulla sindrome di Alport, finanziata dall'Unione Europea, alla quale hanno partecipato 12 paesi, compresa l'Italia. Tale Concerted Action aveva come scopi fornire informazioni sulla storia naturale della ATS, individuare eventuali correlazioni genotipo-fenotipo e la creazione di un database. I risultati ottenuti su 195 famiglie con diagnosi molecolare di XL-ATS sono stati riportati in due lavori, uno riguardanti la storia naturale sui maschi affetti da XL-ATS ed uno sulle femmine portatrici di XL-ATS^{43, 66}. Un dato interessante è che nel 38% delle famiglie erano presenti meno dei 3 criteri per la diagnosi clinica di ATS e nel 12% dei casi la mutazione era de novo⁴³.

I risultati ottenuti nei maschi con XL-ATS hanno confermato che la caratteristica principale della ATS è la microematuria, presente nel 100% dei pazienti esaminati. Nel 95% dei casi era associata a proteinuria. Nel 78% dei pazienti era presente insufficienza renale terminale. Lo studio ultrastrutturale della biopsia renale era disponibile per 98 pazienti, ed in tutti ha evidenziato alterazioni della MBG. L'ipoacusia neurosensoriale progressiva era presente in circa il 79% dei casi, mentre difetti oculari si hanno in circa il 32.5%. Complessivamente, per i pazienti maschi affetti dalla forma ATS-XL è stato stimato un rischio pari al 90% di sviluppare insufficienza renale e ipoacusia entro i 40 anni. Per quanto

riguarda la correlazione genotipo-fenotipo, è stato evidenziato un coinvolgimento renale più severo nei pazienti che presentano mutazioni che portano alla produzione di una proteina tronca (mutazioni nonsense e frameshift) o alla sua totale mancanza (delezioni), rispetto ai pazienti con altre mutazioni. Nei pazienti con mutazioni che portano alla produzione di una proteina tronca o alla sua mancanza è stato calcolato che il rischio di insufficienza renale entro i 30 anni è del 90%. Tale rischio sarebbe del 70% per i pazienti con produzione di proteina riarrangiata (alterazioni dei siti di splicing) e si ridurrebbe invece al 50% per quelli con una singola sostituzione aminoacidica^{43,67}.

I risultati ottenuti nelle femmine portatrici di ATS-XL hanno evidenziato una manifestazione clinica decisamente più lieve, e spesso in esse l'unica manifestazione della malattia resta la microematuria⁶⁶. Anche in questo caso, quindi, la manifestazione principale è la microematuria, presente nel 96% delle femmine portatrici. Tale dato indica che femmine con mutazioni nel gene *COL4A5* possono essere, seppur raramente, asintomatiche. La proteinuria era presente nel 75% delle femmine studiate, mentre le anomalie oculari (molto raramente rappresentate da lenticono) e l'ipoacusia sono presenti rispettivamente nel 15% e nel 28% delle pazienti. Complessivamente questo studio ha confermato che la prognosi nelle femmine eterozigoti è decisamente migliore, con un rischio di sviluppare insufficienza renale terminale prima dei 40 anni che si aggira intorno al 12%, rischio che tuttavia aumenta fino al 30% se considerato a 60 anni. E' comunque importante sottolineare che in generale la XL-ATS è caratterizzata da una notevole eterogeneità intrafamiliarità del quadro clinico delle femmine. Tale eterogeneità rende difficile stabilire la prognosi nelle singole pazienti anche quando sia nota la storia clinica di altre parenti femmine. A conferma di ciò, nelle femmine la correlazione genotipo-fenotipo non ha portato a risultati statisticamente significativi.

L'analisi molecolare del gene *COL4A5*, responsabile di XL-ATS, è disponibile presso l'U.O.C. Genetica Medica dell'Università di Siena, dal 1994 come prestazione del SSN. La ricerca di mutazioni puntiformi in tale gene viene attualmente effettuata tramite la tecnica del DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)⁶⁸. Essa rappresenta una metodica veloce ed efficace in grado di effettuare l'analisi molecolare di tutti i 51 esoni che compongono il gene *COL4A5*. L'analisi molecolare completa richiede non meno di 12 mesi, dal momento che vengono analizzate tutte le regioni codificanti, le giunzioni esone introne e non vi sono mutazioni ricorrenti. Una volta identificata una alterazione in uno degli esoni del gene mediante DHPLC, viene effettuato il sequenziamento automatico di quell'esone per identificare un'eventuale mutazione patogenetica. Nella nostra casistica tale tecnica presenta, comunque, una sensibilità di solo il 50%. Ciò può essere in parte legato al fatto che la

sensibilità della DHPLC è massima per le mutazioni in eterozigosi, per cui nelle femmine portatrici di XL-ATS, mentre per mutazioni in emizigosi è necessario unire il DNA del paziente con un DNA di maschio sano di controllo. Inoltre, nel 15-20% dei casi, l'XL-ATS è dovuta ad ampie delezioni che coinvolgono totalmente o parzialmente il gene *COL4A5*. Nell'iter diagnostico-assistenziale tali riarrangiamenti non vengono specificamente ricercati, se non con la semplice PCR. Questo significa che nel caso di mancata amplificazione di alcuni esoni in un maschio con XL-ATS, si sospetta una delezione, che viene ricercata con altra tecnica. Si prevede, comunque, di iniziare a caratterizzare tali riarrangiamenti tramite tecniche con buon rapporto costo-beneficio⁴³. In tal senso è stata recentemente messo in commercio un kit MLPA (SALSA P191/P192 Alport kits), contenente sonde per 48 dei 51 esoni del gene *COL4A5* ed per i primi due esoni del gene *COL4A6*. Tale kit è stato utilizzato nel nostro laboratorio per la diagnosi dell'associazione ATS-DL e si prevede di introdurre tale metodica nella diagnostica dell'ATS X-legata. L'analisi molecolare dell'ATS X-legata potrebbe, quindi, essere effettuata mediante l'impiego combinato di tecniche di MLPA e DHPLC. Si potrebbe inoltre ipotizzare di utilizzare per la ricerca della mutazioni puntiformi, in alternativa al DHPLC, la metodica del sequenziamento automatico. Tale tecnica, oltre ad essere estremamente affidabile nel caratterizzare esattamente le mutazioni, permetterebbe di inserire nello screening i maschi emizigoti. Lo svantaggio nell'utilizzo del sequenziamento automatico consiste nel fatto che il campione viene sottoposto a vari passaggi prima di poter essere analizzato per sequenza aumentando ulteriormente i tempi di screening. Oggi vengono proposti strumenti di sequenziamento automatico multi-capillare, che potrebbero rendere tale metodica applicabile allo studio di geni di grandi dimensioni. In futuro, presso l'UOC Genetica Medica di Siena si pensa di impostare lo screening per ATS X-legata iniziando con la metodica dell'MLPA per la ricerca di delezioni esoniche. I casi negativi saranno successivamente analizzati mediante il sequenziamento automatico per la ricerca di mutazioni puntiformi. Questo consentirà di aumentare la sensibilità diagnostica degli screening per XL-ATS.

2.6 LA SINDROME DI ALPORT AUTOSOMICA RECESSIVA

La forma autosomica recessiva della sindrome di Alport (AR-ATS, OMIM#203780) è responsabile di circa il 10-15% dei casi di ATS. L'AR-ATS è dovuta a mutazioni nel gene *COL4A3* oppure nel gene *COL4A4*. Tali geni sono localizzati sul cromosoma 2, banda q35²⁴,²⁶. Studi di immunostochimica avevano già nel 1989 riscontrato l'assenza delle catene $\alpha 3$ e $\alpha 4$ nelle MBG dei pazienti con ATS⁶⁹. Il coinvolgimento definitivo di tali geni è stato confermato dalla scoperta di mutazioni in alcune famiglie⁷⁰.

I geni *COL4A3* e *COL4A4* sono costituiti rispettivamente da 52 e 48 esoni. La loro struttura è simile a quella descritta per il gene *COL4A5* e comprende tre domini, un dominio N terminale chiamato 7S, un dominio centrale a tripla elica ed un dominio C terminale globulare. Il dominio collagenico a tripla elica è caratterizzato da sequenze del tipo Gly-X-Y. Le interruzioni del motivo Gly-X-Y sono 23 nel *COL4A3* e 26 nel *COL4A4*.

Un individuo affetto da AR-ATS presenta due copie mutate del gene *COL4A3* o del gene *COL4A4*. Le mutazioni possono essere presenti in omozigosi, soprattutto nei casi in cui è presente consanguineità tra i genitori, od in eterozigosi composta, ed in questo caso generalmente le due diverse mutazioni sono trasmesse da due portatori non imparentati. In questa forma la patologia si presenta con la medesima severità sia nei maschi che nelle femmine ed i pazienti raggiungono l'insufficienza renale durante la prima o la seconda decade di vita. I genitori eterozigoti possono essere completamente asintomatici o presentare microematuria^{24,70}.

La trasmissione autosomica recessiva della malattia è suggerita da alcune caratteristiche fenotipiche e dell'albero genealogico: 1) presenza di femmine affette gravemente quanto i maschi 2) assenza di sintomatologia nei genitori, che possono avere microematuria o nessun segno clinico 3) presenza di consanguineità nella famiglia. È importante osservare che nella casistica raccolta in uno Studio Multicentrico Italiano in realtà il tasso di consanguineità è molto basso, se paragonato alle casistiche provenienti da altri paesi europei. Pertanto, il numero di famiglie con ATS-AR individuate nella casistica italiana è più basso rispetto a quella europea. A conferma di ciò sono stati riportate famiglie italiane con ATS-AR con mutazioni in eterozigosi composta¹⁴. Inoltre, anche se la ATS-AR è stata tradizionalmente descritta come una malattia severa, la forma AR-ATS è stata associata ad un ampio spettro fenotipico e, su base prettamente clinica può non essere distinguibile dalla forma AD-ATS o XL.ATS.

L'analisi dei geni *COL4A3* e *COL4A4* è disponibile presso la Genetica Medica di Siena come prestazione del SSN, dal 2002. La tecnica attualmente utilizzata è quella della DHPLC che rappresenta un metodo rapido e veloce per l'analisi molecolare di due geni molto grandi come il *COL4A3* ed il *COL4A4*. Anche in questo caso, dal momento che vengono analizzate tutte le regioni codificanti, le giunzioni esone introne e non vi sono mutazioni ricorrenti, l'analisi molecolare completa di ciascun gene richiede non meno di 12 mesi. La sensibilità della DHPLC è massima per le mutazioni in eterozigosi, mentre quando si sospetta una mutazione in omozigosi, quindi in pazienti con AR-ATS soprattutto se viene riferita consanguineità tra i genitori, è necessario unire il DNA del paziente con un DNA di controllo. Ciò aumenta il numero di passaggi e quindi i tempi dello screening. Un altro elemento che rende laboriosa l'indagine è il fatto che i geni *COL4A3* e *COL4A4* presentano molti polimorfismi, cioè delle varianti frequenti nella popolazione generale e senza significato patogenetico. Il riscontro di un profilo alterato al DHPLC può quindi indicare sia una mutazione patogenetica che un polimorfismo. In ogni caso, l'amplicone in cui si è trovato il profilo alterato viene analizzato tramite sequenziamento automatico, infatti una mutazione potrebbe avere un profilo simile ad un polimorfismo noto o il polimorfismo potrebbe nascondere una mutazione patogenetica nello stesso amplicone. Non vengono attualmente ricercati larghi riarrangiamenti, in particolare delezioni multi-esoniche, in questi geni.

2.7 LA SINDROME DI ALPORT AUTOSOMICA DOMINANTE

L'esistenza di una forma autosomica dominante di ATS è stata per lungo tempo messa in discussione fino a quando, a partire dal 2000, sono state identificate mutazioni in eterozigosi a carico del gene *COL4A3* o del gene *COL4A4* in famiglie con AD-ATS^{14, 31, 68}. La presenza di una forma autosomica dominante spiega la presenza del 17% dei figli maschi affetti da padre affetto riportata da Shaw e Kallen nel 1976²². Nel 1997, uno studio di linkage una famiglia con ATS e albero genealogico indicativo di ereditarietà autosomica dominante, suggeriva l'associazione tra i geni *COL4A3/COL4A4* e l'ATS-AD⁷¹. La successiva caratterizzazione a livello molecolare di tale famiglia ha evidenziato una mutazione di splicing a carico del gene *COL4A3*, che causa la perdita dell'esone 21³¹. Tale mutazione segregava nella famiglia con la malattia ed era presente, in eterozigosi, in tutti i membri affetti, rappresentando la prima evidenza molecolare dell'esistenza della forma autosomica dominante della sindrome di Alport. Si inizia in questo modo a definire la ATS-AD anche clinicamente. Questa viene infatti inquadrata come una forma complessivamente più lieve della malattia: tutti i membri affetti della famiglia ad eccezione del probando e del padre, presentano solo microematuria e proteinuria, con una lieve compromissione della funzionalità renale. Il probando, raggiunge l'insufficienza renale terminale a 35 anni e presenta una lieve ipoacusia neurosensoriale, mentre il padre è riferito soffrire di insufficienza renale prima della morte.

Dal nostro gruppo, sono stati descritti vari casi di ATS-AD¹⁵. In un primo lavoro sono stati descritti tre casi sporadici e uno familiare. Tre casi presentano mutazioni in eterozigosi nel gene *COL4A3*, mentre un caso ha una mutazione nel gene *COL4A4*. Nel lavoro presente in questa tesi vengono descritte altre 8 famiglie con ATS-AD e mutazioni nel gene *COL4A4*¹⁵. L'insieme di questi dati conferma l'esistenza della forma ATS-AD, a lungo dibattuta. Tale forma è un'entità clinicamente distinta rispetto alla forma autosomica recessiva, nota già da tempo, ed è caratterizzata da una lenta progressione del danno renale, da una consistente variabilità intra ed interfamiliare e da una penetranza che sembra aggirarsi intorno al 95%⁶⁸. I pazienti mostrano un quadro clinico caratterizzato da microematuria, solo in una parte dei casi proteinuria e rischio di sviluppare insufficienza renale dopo la terza decade. Le manifestazioni extra-renali non sono frequenti, con una parte dei pazienti che sviluppano ipoacusia neurosensoriale in età avanzata. Nei pazienti con la forma autosomica dominante, ad oggi, non sono descritte le anomalie oculari caratteristiche dell'ATS. Tale forma è apparentemente molto rara ma probabilmente la sua frequenza è sottostimata. Rifacendosi ai dati di Shaw e Kallen del '76 sopra citati potrebbe ammontare a circa il 17% di tutti i casi di

sindrome di Alport. Soprattutto quando si analizzano nuclei familiari piccoli, può essere difficile distinguere tra forma autosomica dominante e forma ATS-XL. Al fine di stabilire, all'interno di ciascuna famiglia, la corretta modalità di segregazione della malattia sono necessarie accurate valutazioni cliniche e un'attenta valutazione dell'albero genealogico⁷².

La forma autosomica dominante di ATS è causata da mutazioni nei geni *COL4A4* e *COL4A3*, come la forma autosomica recessiva.

Nel laboratorio dell'UOC Genetica Medica di Siena, tale indagine viene effettuata mediante DHPLC e sequenziamento automatico per identificare le mutazioni puntiformi. Tale indagine permette di evidenziare mutazioni puntiformi nei due geni coinvolti, mentre non è attualmente disponibile un metodo per l'analisi di delezioni intrageniche.

Original Article

Autosomal dominant Alport syndrome: molecular analysis of the *COL4A4* gene and clinical outcome

Elena Marcocci¹, Vera Uliana¹, Mirella Bruttini¹, Rosangela Artuso¹, Margherita Cirillo Silengo², Marlenka Zerial³, Franco Bergesio⁴, Antonio Amoroso⁵, Silvana Savoldi⁶, Marco Pennesi⁷, Daniela Giachino⁸, Giuseppe Rombolà⁹, Giovanni Battista Fogazzi¹⁰, Cristina Rosatelli¹¹, Ciro Dresch Martinhago¹², Mario Carmellini¹³, Roberta Mancini¹, Giuseppina Di Costanzo¹, Ilaria Longo¹, Alessandra Renieri¹ and Francesca Mari¹

¹Medical Genetics, Department of Molecular Biology, University of Siena, Italy, ²Clinical Genetic Unit, Department of Pediatrics, University of Turin, Italy, ³Department of Pediatrics, M. Bufalini Hospital, Cesena, Italy, ⁴Nephrology and Dialysis Units, Azienda Ospedaliera Careggi, Florence, Italy, ⁵Transplantation Immunology, San Giovanni Battista Hospital, Torino, Italy, ⁶Nephrology and Dialysis Units, Ospedale di Cirié, Cirié, Italy, ⁷Department of Pediatrics, IRCCS Burlo Garofolo Trieste, Trieste, Italy, ⁸Department of Clinical and Biological Sciences, Division of Medical Genetics, University of Turin, Orbassano, Italy, ⁹Nephrology and Dialysis Units, S. Andrea Hospital, La Spezia, Italy, ¹⁰Nephrology and Dialysis Units, Fondazione IRCCS, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano, Italy, ¹¹Department of Biomedical Sciences and Biotechnology, University of Cagliari, Italy, ¹²Department of Medical Genetics, RDO Medical Diagnosis, São Paulo, Brazil and ¹³Transplantation Surgery, University of Siena, Siena, Italy

Abstract

Background. Alport syndrome is a clinically and genetically heterogeneous nephropathy characterized by glomerular basement membrane lesions often associated with hearing loss and ocular anomalies. While the X-linked and the autosomal recessive forms are well known, the autosomal dominant form is not well acknowledged.

Methods. We have clinically investigated 38 patients with a diagnosis of autosomal dominant Alport syndrome belonging to eight different families. The analysis of the *COL4A4* gene was performed by denaturing high performance liquid chromatography and automated DNA sequencing.

Results. In our cohort of patients, only 24.3% (9/37) reached end-stage renal disease, at the mean age of 51.2 years. Four patients had hearing loss (13.3%) and none ocular changes. Molecular analysis revealed eight novel private *COL4A4* gene mutations: three frameshift, three missense and two splice-site mutations.

Conclusions. These data indicate autosomal dominant Alport syndrome as a disease with a low risk of ocular and hearing anomalies but with a significant risk to develop renal failure although at an older age than the X-linked form. We were unable to demonstrate a genotype–phenotype correlation. Altogether, these data make difficult the differential diagnosis with the benign familial haematuria due to heterozygous mutations of *COL4A4* and *COL4A3*, especially in young patients, and with the X-linked form of

Alport syndrome in families where only females are affected. A correct diagnosis and prognosis is based on a comprehensive clinical investigation in as many family members as possible associated with a broadly formal genetic analysis of the pedigree.

Keywords: ADAS; ATS; autosomal dominant Alport syndrome; BFH; *COL4A4*; TBMN

Introduction

Alport syndrome (ATS) is a progressive heterogeneous nephropathy characterized by the association of progressive haematuric nephritis with ultrastructural changes of the glomerular basement membrane (GBM), sensorineural deafness and variable ocular abnormalities [1–3]. ATS accounts for 1–2% of all patients who start renal replacement therapy in Europe, with an estimate frequency of about 1 in 5000 [4–6].

ATS is characterized by changes of type IV collagen $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$ network of the GBM, and three modes of inheritance are known. The X-linked inheritance, due to mutations in *COL4A5* located in Xq22.3, is the most common mode of transmission (XLAS, OMIM 301050). In this form, 70% of affected males reach end-stage renal disease (ESRD) before 30 years (juvenile form), while only few cases (30%) progress towards ESRD after 30 years (rare adult form) [4,5,7]. Usually, females have only microhaematuria; however, a small percentage of females can develop renal failure. The autosomal recessive (ARAS,

Correspondence and offprint requests to: Alessandra Renieri, Medical Genetics, Department of Molecular Biology, University of Siena, V.Le Bracci, 53100 Siena, Italy. Tel: +39-0577-233303; Fax: +39-0577-233325; E-mail: renieri@unisi.it

OMIM 203780) form of the disease is due to mutations in the *COL4A3* and *COL4A4* genes, located in 2q36–37, and is reported in 15% of families in European countries [8–10]. Autosomal recessive transmission due to *COL4A3* and *COL4A4* mutations is suggested by the presence of one of the following features: (i) severe early disease in both females and males; (ii) absence of severe signs in parents (they may be completely asymptomatic or may have isolated microhaematuria); (iii) parental consanguinity.

The autosomal dominant form of ATS has been described more recently (ADAS, OMIM 104200). In 1997, this form had been linked to the *COL4A3*/*COL4A4* locus in a large family from Northern Ireland and 3 years later there came the first report of a *COL4A3* heterozygous mutation segregating in a family with ADAS [11,12]. Till now, only nine families with ADAS and a proven *COL4A4* or *COL4A3* mutation have been reported. Both female and male patients showed a high clinical variability with a renal phenotype ranging from isolated haematuria to late onset ESRD, associated in few instances with hearing loss [11–15].

Heterozygous mutations in *COL4A4* or *COL4A3* genes have been found also in the subset of patients with 'Benign Familial Hematuria' (BFH, OMIM 141200). BFH is clinically defined by persistent glomerular haematuria and by the absence of extra-renal findings [16–18]. The typical ultrastructural findings are diffuse thinning of GBM.

Although the term 'Thin Basement Membrane Nephropathy' (TBMN) is a pure morphological definition, it is still erroneously used to describe patients with the diagnosis of BFH. In fact, the finding of isolated thinning of the basement membrane can represent the only lesion identified in patients with ATS [19].

In this study, we present eight ATS families with autosomal dominant transmission and heterozygous mutations in the *COL4A4* gene. The aim of this study is to better define the natural clinical history of ADAS in order to help in the differential diagnosis with the other known forms of ATS and with BFH.

Subjects and methods

Patients

Thirty-eight patients belonging to eight families with a clinical suspect of ADAS were enrolled in this study. Patients were diagnosed by experienced nephrologists and clinical geneticists. Urinalysis and renal function evaluations were performed in all patients. Audiological and ophthalmic examinations were performed in several patients. Whenever indicated, a renal biopsy with ultrastructural study by electron microscopy was performed.

Mutation analysis

Blood samples were collected from patients after informed consent. Genomic DNA was extracted using a QIAamp DNA blood maxi kit, according to the manufacturers' protocol (Quiagen, Hilden, Germany). All the *COL4A4* exons were amplified using the primers and PCR condition already described [14]. Mutation analysis was performed

by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) using Transgenomic WAVE™ (Transgenomic, San Jose, CA, USA) and by subsequent genomic sequencing analysis. PCR products were denatured at 95°C, re-annealed at 65°C for 10 min and cooled at 4°C to generate heteroduplex [15]. The optimal column temperature for fragments analysis was calculated using the WaveMaker Software (Transgenomic, San Jose, CA, USA). DHPLC analysis was performed at the melting temperature of 60°C for exon 25, 60.2°C for exon 22, 60.6°C for exon 28, 57.7°C for exon 46, 55.3°C for exon 35 and 54°C for exon 16. PCR products resulting in abnormal DHPLC profiles were purified and sequenced on both strands by using a PE Big dye terminator cycle sequencing kit on an ABI Prism 310 genetic analyser (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Segregation analysis was performed by direct sequencing in all families.

Results

A *COL4A4* mutation in eight families with ADAS has been identified by DHPLC analysis (Figure 1). Detailed clinical information of a total of 38 patients belonging to these eight families has been collected (Table 1). The molecular diagnosis was confirmed in 29/38 patients. The remaining nine patients were either deceased or unavailable.

COL4A4 mutations

The eight identified pathogenic mutations were all in a heterozygous state, private and previously not described (Supplementary Figure 1). Seven mutations were distributed in the collagenic domain, and one mutation was localized in the C-terminal domain (Figure 2a). Three were frameshift mutations leading to a protein truncation within the collagenous domain (families MVA and MRM) or in the C-terminal domain in one family (family EVI). Three were missense mutations leading to glycine substitutions in the collagenous domain (families GEI, PUX and LCR). Two were splice-site mutations localized in intron 28 and 35 (families DAG and FRI).

During the DHPLC screening, we also identified 11 previously reported polymorphisms and one rare variant (Table 2).

Clinical data

Clinical features of the 38 affected individuals are described in Table 1. Their mean age is 34 years (range from 6 to 76 years). Six patients died with ESRD at the mean age of 58.3 years (range, 46–68 years). The main clinical manifestation was microscopic haematuria, which was present in 100% of patients. Gross haematuria occurred in 2/37 patients (5.4%). Proteinuria was present in 18/36 patients with known urinalysis (50%). Renal failure occurred in 12/37 patients (32.4%). Among these, three patients aged 34, 43 and 49 years presented CRF (creatinine 1.48 mg/dl and 1.53 mg/dl in the last two cases). The remaining nine patients developed ESRD: six patients reached ESRD after the age of 40 years, at a mean age of 51.2 year (range,

Table 1. Clinical and molecular data of reported patients

| Family/subject | Sex | Age | Urinalysis | Renal function | GBM abnor- | Ophthalmic | Audiological | COL4A4 heterozygous mutation | | | COL4A4 heterozygous |
|----------------|-----|-----------------|-----------------------------|-----------------|--------------------------------------|------------------|--------------|------------------------------|------------------|-------------|------------------------------|
| Family/subject | Sex | Age | Urinalysis | Renal function | GBM abnor- | Ophthalmic | Audiological | COL4A4 heterozygous mutation | | | COL4A4 heterozygous |
| | | | | | | | | Nucleotide change | Effect on coding | Exon/intron | polymorphisms |
| | | | | | | | | | sequence | | |
| LCR/III2 | F | 21 | Micro-macrohaematuria | Normal | Thinning, thickening, splitting n.d. | Normal | Normal | 1579G>T | G527C | Exon 22 | None |
| LCR/III3 | M | 11 | Microhaematuria | Normal | n.d. | Normal | Normal | 1579G>T | G527C | Exon 22 | 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 |
| DAG/II | M | 73 | Microhaematuria proteinuria | ESRD at 60 year | n.d. | Normal | Normal | IVS28+2 T>G | IVS28+2 T>G | Intron 28 | 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 |
| DAG/III | M | 49 | Microhaematuria proteinuria | CRF | Thinning | n.d. | Normal | IVS28+2 T>G | IVS28+2 T>G | Intron 28 | 2, 4, 5, |
| DAG/III1 | M | 20 | Microhaematuria | Normal | n.d. | n.d. | n.d. | IVS28+2 T>G | IVS28+2 T>G | Intron 28 | 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 |
| DAG/III2 | F | 11 | Microhaematuria | Normal | n.d. | n.d. | n.d. | IVS28+2 T>G | IVS28+2 T>G | Intron 28 | 5 |
| FRI/II2 | F | 66 [^] | Microhaematuria proteinuria | ESRD | n.d. | Normal | Normal | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |
| FRI/II2 | F | 64 | Microhaematuria proteinuria | ESRD at 60 year | n.d. | Normal | Normal | IVS35+1G>A | IVS35+1G>A | Intron 35 | None |
| FRI/II3 | M | 55 | Microhaematuria proteinuria | ESRD at 45 year | Thinning, thickening, splitting | Cataract post-tx | Normal | IVS35+1G>A | IVS35+1G>A | Intron 35 | 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 |
| FRI/III2 | M | 42 | Microhaematuria | Normal | n.d. | Normal | Normal | IVS35+1G>A | IVS35+1G>A | Intron 35 | 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 |
| FRI/III3 | F | 40 | Microhaematuria proteinuria | Normal | n.d. | Normal | Normal | IVS35+1G>A | IVS35+1G>A | Intron 35 | 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 |
| FRI/III6 | M | 34 | Microhaematuria proteinuria | CRF | n.d. | Normal | Normal | IVS35+1G>A | IVS35+1G>A | Intron 35 | None |
| FRI/IV1 | F | 16 | Microhaematuria proteinuria | Normal | n.d. | n.d. | Normal | IVS35+1G>A | IVS35+1G>A | Intron 35 | 2, 5, 6, 7, 10, 11, 12 |
| FRI/IV3 | F | 11 | Microhaematuria | Normal | n.d. | Normal | Normal | IVS35+1G>A | IVS35+1G>A | Intron 35 | 2, 5, 6, 7, 10, 11, 12 |
| FRI/IV4 | M | 9 | Microhaematuria | Normal | n.d. | Normal | Normal | IVS35+1G>A | IVS35+1G>A | Intron 35 | 2, 5, 6, 7, 10, 11, 12 |
| FRI/IV5 | F | 6 | Microhaematuria | Normal | n.d. | Normal | Normal | IVS35+1G>A | IVS35+1G>A | Intron 35 | 2, 6, 7, 10, 11, 12 |

ESRD: end-stage renal disease; GBM: glomerular basement membrane; c.h.l.: conductive hearing loss; s.h.l.: sensoryneural hearing loss; n.d.: not defined; n.a.: DNA not available; [^]: deceased; M: male; F: female, GBM: glomerular basement membrane.

Numbers in the last column refer to polymorphisms numbers of the Table 2.

| | | | | | | | | | | | |
|----------|---|----|-----------------------------------|------|---------------------------------|--------|--------|---------|-------|---------|-------|
| LCR/III1 | F | 40 | Micro-macrohaematuria proteinuria | ESRD | Thinning, thickening, splitting | Normal | Normal | 1579G>T | G527C | Exon 22 | 9, 7, |
|----------|---|----|-----------------------------------|------|---------------------------------|--------|--------|---------|-------|---------|-------|

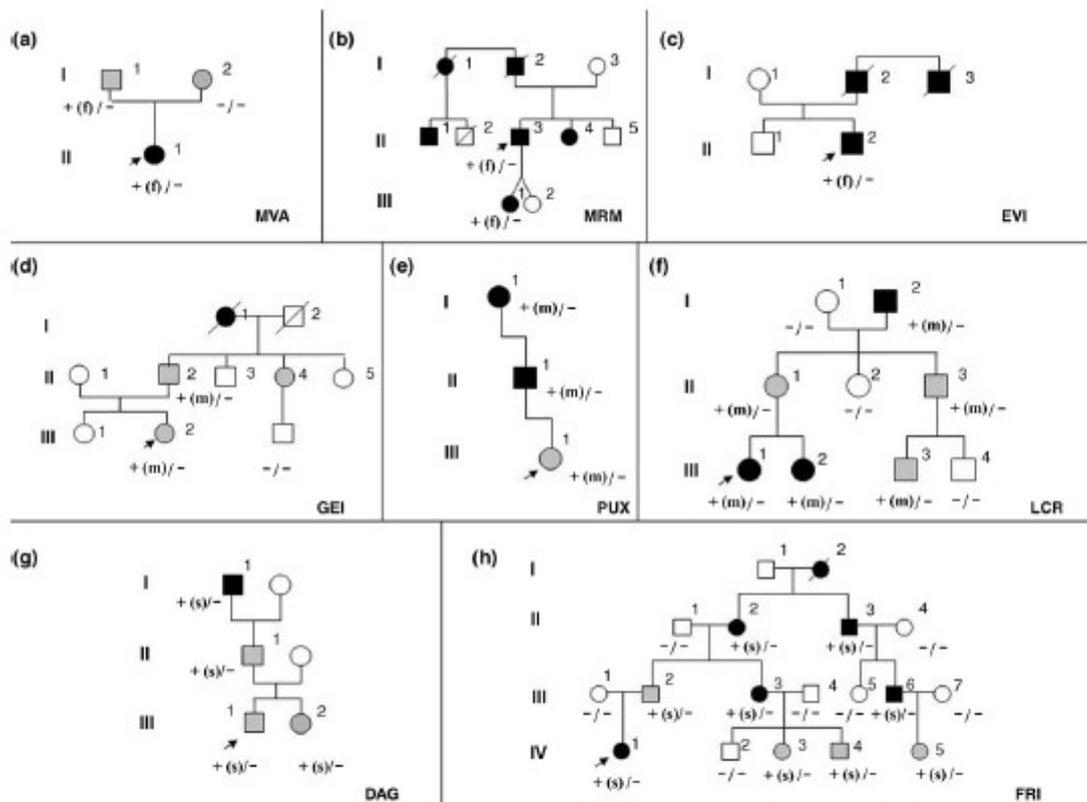


Fig. 1. Pedigree of families. The figure represents the pedigree of family 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d), 5 (e), 6 (f), 7 (g), 8 (h). □ Males, ○ females. Filled grey symbols are individuals with isolated microhaematuria. Filled black symbols indicate individuals with microhaematuria plus macrohaematuria or proteinuria or hypoacusia or renal failure. White symbols indicate individuals without clinical signs of the disease. An oblique bar indicates a deceased individual. The arrows indicate the index patients. The genotype at the *COL4A4* locus is indicated below each symbol as follows: -, wild type allele; +, mutated allele. The type of mutation is indicated in brackets: f = frameshift mutation; m = missense mutation; s = splice site mutation. In (a) case I-2 has microhaematuria probably not related to ATS.

Table 2. Polymorphisms in the *COL4A4* gene

| | Nucleotide change | Effect on coding sequence | Exon/intron |
|----|-------------------------|---------------------------|-------------|
| 1 | IVS5+86C>T ^a | IVS5+86C>T ^a | Intron 5 |
| 2 | 1444C>T | P482S | Exon 21 |
| 3 | 1634G>C | G545A | Exon 23 |
| 4 | IVS28-5C>T | IVS28-5C>T | Intron 28 |
| 5 | 3011T>C | L1004P | Exon 33 |
| 6 | 3594G>A | G1198G | Exon 39 |
| 7 | 3684G>A | K1228K | Exon 39 |
| 8 | 4080A>G | P1360P | Exon 42 |
| 9 | 3979A>G | M1327V | Exon 42 |
| 10 | 4204C>T | P1402S | Exon 44 |
| 11 | 4548A>G | V1516V | Exon 47 |
| 12 | 4932C>T | F1644F | Exon 48 |

^aNot reported as polymorphism (rare variant).

42–67 years), two died at 60 and 66 years of age and for the last patient no clinical data are available.

An ultrastructural examination of the GBM was performed in 8 patients (range of age at renal biopsy from

14 to 43 years) belonging to seven families. Alterations of GBM were identified in all. In six patients, the ultrastructural alterations were clearly diagnostic for ATS, showing a combination of thinning, thickening and splitting of the GBM, while in two patients isolated GBM thinning was identified (EVI-II2, age at biopsy 26 years and DAG III, age at biopsy 29 years).

Bilateral hearing deficit in the 2000–8000 HZ range, with an onset after 40 years, developed in 4 of 30 tested patients (13.3%). Ocular changes were found in 1 of 30 tested patients (3.3%): this patient, aged 55 years, presented bilateral cataract post-renal transplantation attributed to steroid therapy.

Discussion

ATS and BFH are type IV collagen inherited disorders associated with heterozygous mutations in *COL4A3* and *COL4A4* genes. Till now, only 43 patients belonging to

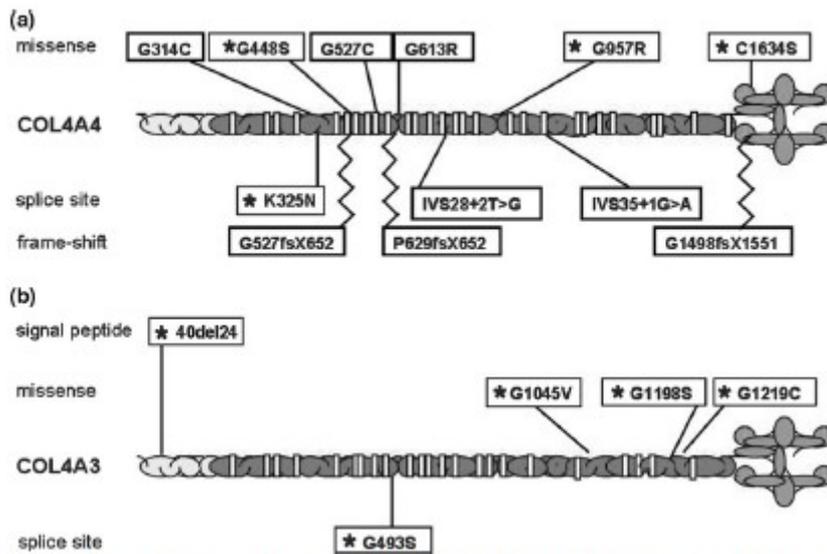


Fig. 2. Distribution of pathogenic mutations along *COL4A4* (A) and *COL4A3* (B) genes in ADAS patients. *mutations previously reported as associated with ADAS. All the others are novel mutations reported here.

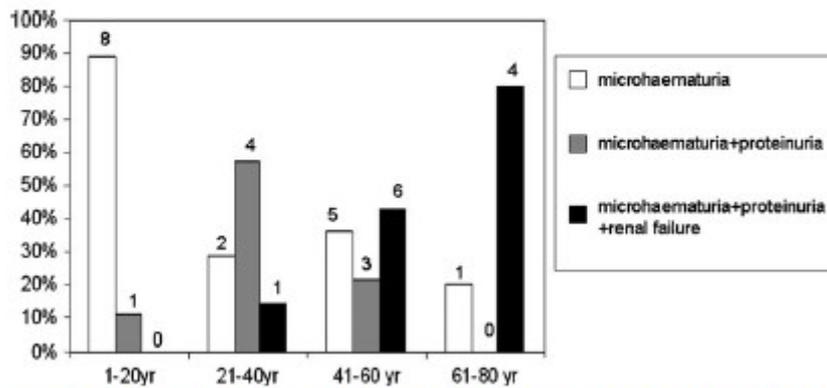


Fig. 3. Graphic representing the phenotype of our 35 patients at different ages. Patients have been divided in four classes of age (0–20; 21–40; 41–60; 61–80) and they have been classified according to their renal involvement. The white bar represents patients with isolated microhaematuria, the grey bar represents cases with microhaematuria and proteinuria and the black bar represents patients with renal failure (both IRC and ESRD). Above each column, the absolute number of patients is reported.

nine families with ADAS have been reported with either *COL4A3* or *COL4A4* mutations [11–15].

In this study, we showed the clinical outcome and the molecular data of 38 patients with ADAS belonging to eight families in whom a pathogenic *COL4A4* mutation was identified (Table 1).

In this series of patients, haematuria, usually microscopic, was present in all cases with known urine analysis, while proteinuria was present in nearly 40% of patients. The development of renal failure was progressive with the age (Figure 3): only one patient (7.1%) younger than 40 years (1/14) presented CRF; two patients among those aged between 41 and 50 years (2/10; 20%) showed renal failure (one patient with ESRD and one patient with CRF); among pa-

tients aged between 51 and 60 years, four developed ESRD (4/6; 67%) and four out of five patients older than 60 years developed ESRD (80%).

GBM alterations were identified in all patients in whom a renal biopsy was performed. Only for one family, renal biopsy has not been performed. However, the hypothesis of a diagnosis of ATS is propped by the clinical manifestation of affected members of the family and by the identification of a disease segregating mutation in the *COL4A4* gene leading to a glycine substitution in the collagenous domain of the protein [5]. The ultrastructural study of renal biopsy in almost all patients revealed a combination of thickening, splitting and thinning of the GBM. It is worth noting that two unrelated patients (aged 26 and 29 years) showed

prognosis is based on a combination of a comprehensive clinical investigation of all family members, including examination of renal and extra-renal signs of ATS in older members, associated with a broadly formal genetic analysis of the pedigree.

Acknowledgements. This work was supported by a FIRB grant (RBIP00PMF2) to AR. The authors thank Viviana Sanza for technical support.

Conflict of interest statement. None declared.

Supplementary data

Supplementary data is available online at <http://ndt.oxfordjournals.org>.

References

1. Alport AC. Hereditary familial congenital hemorrhagic nephritis. *Brit Med J* 1927; 1: 504–506
2. Kashtan CE, Michael AF. Alport syndrome. *Kidney Int* 1996; 50: 1445–1463
3. Flinter F. Alport's syndrome. *J Med Genet* 1997; 34: 326–330
4. Myers JC, Jones TA, Pohjolainen ER *et al*. Molecular cloning of $\alpha 5(\text{IV})$ collagen and assignment of the gene to the region of the X chromosome containing the Alport syndrome locus. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 1024
5. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I *et al*. X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 649–657
6. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I *et al*. X-linked Alport syndrome: natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families: a 'European Community Alport Syndrome Concerted Action' study. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2603–2610
7. Flinter FA, Cameron JS, Chantler C *et al*. Genetics of classic Alport's syndrome. *Lancet* 1988; ii: 1005–1007
8. Smeets HJ, Lemmik HH, Van Den Heuvel LPea. Molecular and immunological studies in X-linked and autosomal recessive in Alport syndrome. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 1230
9. Knebelmann B, Benessey F, Buemi M *et al*. Autosomal recessive (AR) inheritance in Alport syndrome (AS). *J Am Soc Nephrol* 1993; 4: 263
10. Longo I, Scala E, Mari F *et al*. Autosomal recessive Alport syndrome: an in-depth clinical and molecular analysis of five families. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 665–671
11. Jefferson JA, Lemmik HH, Hughes AE *et al*. Autosomal dominant Alport syndrome linked to the type IV collagen $\alpha 3$ and $\alpha 4$ genes (*COL4A3* and *COL4A4*). *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1595–1599
12. Van Der Loop FT, Heidet L, Timmer ED *et al*. Autosomal dominant Alport syndrome caused by a *COL4A3* splice site mutation. *Kidney Int* 2000; 58: 1870–1875
13. Ciccarese M, Casu D, Ki Wong F *et al*. Identification of a new mutation in the $\alpha 4(\text{IV})$ collagen gene in a family with autosomal dominant Alport syndrome and hypercholesterolaemia. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 2008–2012
14. Longo I, Porcedda P, Mari F *et al*. *COL4A3/A4* mutation: from benign familial hematuria to autosomal dominant or recessive Alport syndrome. *Kidney Int* 2002; 61: 1947–1956
15. Pescucci C, Mari F, Longo I *et al*. Autosomal-dominant Alport syndrome: natural history of a disease due to *COL4A3* or *COL4A4* gene. *Kidney Int* 2004; 65: 1598–1603
16. Buzza M, Wang Y, Dagher H *et al*. *COL4A4* mutation in thin basement membrane disease previously described in Alport syndrome. *Kidney Int* 2001; 60: 480–483
17. Tazon Vega B, Badenas C, Ars E *et al*. Autosomal recessive Alport's syndrome and benign familial hematuria are collagen type IV diseases. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 952–959
18. Rana K, Tonna S, Wang YY *et al*. Nine novel *COL4A3* and *COL4A4* mutations and polymorphisms identified in inherited membrane diseases. *Pediatr Nephrol* 2007; 22: 652–657
19. Frasca GM, Onetti-Muda A, Mari F *et al*. Thin glomerular basement membrane disease: clinical significance of a morphological diagnosis—a collaborative study of the Italian Renal Immunopathology Group. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 545–551
20. Voskarides K, Damianou L, Neocleous V *et al*. *COL4A3/COL4A4* mutations producing focal segmental glomerulosclerosis and renal failure in thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 3004–3016
21. Badenas C, Praga M, Tazon B *et al*. Mutations in the *COL4A4* and *COL4A3* genes cause familial benign hematuria. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1248–1254
22. Wang Y, Rana K, Tonna S *et al*. *COL4A3* mutations and their clinical consequences in thin basement membrane nephropathy (TBMN). *Kidney Int* 2004; 65: 786–790
23. Slajpah M, Gorinsek B, Berginc G *et al*. Sixteen novel mutations identified in *COL4A3*, *COL4A4*, and *COL4A5* genes in Slovenian families with Alport syndrome and benign familial hematuria. *Kidney Int* 2007; 71: 1287–1295

Received for publication: 3.9.08

Accepted in revised form: 14.11.08

2.8 MICROEMATURIA FAMILIARE BENIGNA E NEFROPATIA DELLE MEMBRANE SOTTILI

Mutazioni in eterozigosi dei geni *COL4A3* e *COL4A4* sono responsabili sia della forma autosomica dominante di ATS, che della cosiddetta nefropatia delle membrane basali sottili (TBMD, Thin Basement Membrane Nephropathy) o microematuria familiare benigna (BFH). Di seguito, cercherò di spiegare cosa si intende per questi due termini.

Il termine BFH è una definizione clinica ed indica famiglie in cui si ha una trasmissione verticale di una microematuria glomerulare. Raramente è presente proteinuria, mentre sono assenti segni extra-renale o la progressione in insufficienza renale. La BFH si comporta come una patologia a trasmissione autosomica dominante ed ha un'incidenza di circa l'1%. Quando viene effettuato lo studio ultrastrutturale della biopsia renale in questi pazienti spesso si riscontra solamente un assottigliamento della MBG.

Il termine TBMN è una definizione morfologica, che indica soggetti in cui lo studio ultrastrutturale della biopsia renale ha evidenziato assottigliamento delle MBG isolato. Spesso da un punto di vista clinico questi pazienti presentano una microematuria isolata. La progressione della TBMD verso l'insufficienza renale cronica, anche se riportata in letteratura è molto rara¹⁶.

I due termini non sono esattamente interscambiabili. Infatti non tutti i casi di TBMN sono familiari e non tutti i casi di ematuria familiare sono causati da TBMN. Inoltre l'assottigliamento isolato della MBG può rappresentare l'unica alterazione ultrastrutturale nella ATS.

Da un punto di vista genetico la TBMD e la BFH sono probabilmente eterogenee, ma poiché un assottigliamento diffuso della MBG è presente anche in soggetti con ATS, specie nello stadio precoce, è stata suggerita una stessa base biologica⁷³. Nel 1996 è stata riportata una famiglia con AR-ATS in cui nove soggetti del ramo paterno, che mostravano evidenze cliniche di BFH, erano tutti eterozigoti per una mutazione a carico del gene *COL4A4*²⁷. Tale lavoro suggeriva che i soggetti affetti da BFH potessero essere dei portatori della AR-ATS. La conferma è arrivata nel 1998 quando, studiando la AR-ATS, è stata individuata una famiglia in cui una mutazione del gene *COL4A4* in eterozigosi segregava con microematuria ed assottigliamento della membrana basale²⁸. Infine nel 2001 è stata riportata per la prima volta una famiglia in cui la TBMD era associata ad una mutazione in eterozigosi nel gene *COL4A4*, ma nessun membro della famiglia mostrava ATS-AR o ATS-XL²⁹. La stessa mutazione

riportata da Buzza, era stata precedentemente identificata da Boye, nel 1998, in eterozigosi composta, in una famiglia con AR-ATS. Successivamente è stato dimostrato che anche mutazioni nel gene *COL4A3* sono responsabili di TBMD⁷⁴. Pertanto, secondo le conoscenze attuali, i portatori di mutazioni in eterozigosi per il gene *COL4A4* o *COL4A3* possono essere portatori asintomatici di ATS-AR, presentare BFH, o essere affetti da AD-ATS.

Ricordiamo infine che in alcune famiglie con BFH l'analisi di linkage ha escluso un'associazione con i geni *COL4A3* e *COL4A4*, indicando il coinvolgimento di altri geni nella BHF⁷³. Secondo i dati di letteratura, mutazioni a carico dei geni *COL4A3* e *COL4A4* sarebbero responsabili di circa il 40% dei casi⁷⁴. Un successivo studio dimostra, inoltre, che pazienti con diagnosi di TBMD e portatori di una mutazione nei geni del collagene *COL4A4* o *COL4A3* potrebbero probabilmente presentare una forma non troppo benigna della malattia¹⁶. Quindi, occorre stare attenti nell'utilizzare il termine microematuria familiare benigna, visto che spesso in pazienti con tali diagnosi clinica, la raccolta accurata dell'anamnesi familiare evidenzia casi di insufficienza renale in età adulta-anziana¹⁶. Un'adeguata diagnosi e prognosi, richiede una ricostruzione della storia familiare in almeno tre generazioni, con attenta analisi formale dell'albero genealogico, prestando particolare attenzione ad ipoacusia e insufficienza renale anche in età avanzata.

2.9 SINDROME DI ALPORT – LEIOMIOMATOSI DIFFUSA

L'associazione sindrome di Alport – leiomiomatosi diffusa (ATS-DL) è una rara sindrome da delezione di geni contigui, causata da una delezione che coinvolge la porzione 5' del gene *COL4A5*, la porzione 5' del gene *COL4A6* e la regione intergenica. Il breakpoint distale della delezione è variamente localizzato nel gene *COL4A5* mentre il breakpoint prossimale in tutti i casi descritti in letteratura è localizzato all'interno dell'ampio introne 2 del gene *COL4A6*. Il meccanismo con cui tale delezione causa l'ATS-DL è ignoto.

I pazienti con ATS-DL manifestano una forma X-legata di ATS, in cui come precedentemente riportato il coinvolgimento renale e l'ipoacusia sono più gravi nei maschi che nelle femmine. L'espressione oculare di questa patologia si differenzia dalla XL-ATS per l'elevata incidenza di cataratta congenita, che presenta espressività clinica simile nei maschi e nelle femmine ed ha una penetranza incompleta⁴².

La leiomiomatosi diffusa, associata in questi pazienti alla XL-ATS, è caratterizzata da un'anomala proliferazione della muscolatura liscia, che coinvolge tutti gli strati muscolari ed istologicamente tale proliferazione è benigna, senza nuclei atipici o mitosi anomale⁷⁵. Tale manifestazione colpisce in genere la parete esofagea e, nelle donne, l'apparato genitale femminile (clitoride, vulva, vagina, utero)⁷⁶. A livello esofageo si manifesta come diffusa iperplasia e/o leiomiomi multinodulari nella porzione inferiore dell'esofago, anche se a volte si estende alla porzione superiore dello stomaco e più raramente coinvolge l'intero esofago, dalla giunzione tracheo-esofagea a quella gastro-esofagea. In questa patologia, l'iperplasia diffusa delle cellule muscolari lisce può essere presente anche nell'albero bronchiale, nella porzione membranosa della trachea e raramente in zona perirettale⁷⁵. La localizzazione esofagea è associata a disfagia, odinofagia, dolore retrosternale od epigastrico, rigurgito, vomito post-prandiale ed occasionalmente sanguinamento. Nel caso di un coinvolgimento dell'apparato respiratorio, questi pazienti presentano bronchiti ricorrenti, broncospasmi che simulano l'asma bronchiale, dispnea, tosse, stridore ed apnea⁷⁵. A livello dell'apparato genitale femminile i sintomi variano in base alla localizzazione e nei rari casi di coinvolgimento perirettale può simulare una pseudo ostruzione da agangliosi del retto⁷⁷.

L'associazione sindrome di Alport – Leiomiomatosi è stata descritta per la prima volta nel 1983 in una famiglia messicana da Garcia Torres e Guarner⁷⁸. Nel 1993, studiando soggetti con ATS-DL, in cui era noto essere presente una delezione della porzione 5' terminale del gene *COL4A5*, si è visto che la delezione del *COL4A5* era estesa fino all'introne 2 del gene a monte. In questo modo, è stato identificato il gene *COL4A6*³⁷. Tal gene codifica la catena $\alpha 6$ del collagene di tipo IV ed è localizzato testa a testa rispetto al gene *COL4A5*, con una regione

intergenica molto piccola, che inizialmente fu stimata essere di 450 bp e successivamente è stato dimostrato essere di 292 kb. Nel 1994, è stato dimostrato che tale gene presenta due primi esoni (1 e 1'), alternativamente trascritti⁷⁹. Il meccanismo con cui tali delezioni originano sembra essere legato alla presenza di sequenze consenso per le Topoisomerasi sia nell'introne 1 del gene *COL4A5* che nell'introne 2 del gene *COL4A6*, e alla presenza di due *LINE* (long interspersed repetitive elements), una nell'introne 1 del gene *COL4A5* ed una nell'introne 2 del gene *COL4A6*⁸¹. Tali elementi sono stati individuati proprio studiando i breakpoints delle delezioni in soggetti con ATS-DL⁸¹.

Il meccanismo patogenetico dell'ATS-DL è ancora ignoto. Inizialmente, partendo dal fatto che era noto che delezioni multi-esoniche del gene *COL4A5* con assenza del trascritto erano responsabili di XL-ATS, si è semplicemente ritenuto che come una delezione confinata al gene *COL4A5* causava XL-ATS, quando coinvolgeva anche il gene *COL4A6* fosse associata ad ATS-DL. Si riteneva quindi che l'assenza della catena α_6 , da sola o insieme all'assenza della catena α_5 , potesse distruggere la normale morfogenesi delle cellule muscolari lisce, causandone la proliferazione. Successivamente si è visto che pazienti con delezioni di tali geni che si estendevano prossimamente oltre l'introne 2 del gene *COL4A6*, non presentavano ATS-DL, ma solo il fenotipo ATS⁸⁰. Nei pazienti ATS-DL, in effetti, il breakpoint distale può essere variamente localizzato all'interno del gene *COL4A5*, o ad anche estendersi ai geni fiancheggianti mentre il breakpoint prossimale sembra essere localizzato sempre nell'introne 2 del gene *COL4A6*. Esso è comunque molto grande, circa 146 kb, e tale breakpoint può comunque essere variabilmente localizzato all'interno dell'introne 2 del gene *COL4A6*^{20,80}. Queste considerazioni sono in contrasto con l'ipotesi che la DL derivi dall'assenza della catena $\alpha_6(IV)$ e suggeriscono che l'introne 2 del gene *COL4A6* abbia un ruolo importante nella patogenesi della DL. Sono state, quindi, avanzate varie ipotesi sul ruolo di tale introne. Una prima implicava la presenza di un terzo gene localizzato nell'introne 2 del *COL4A6*, la cui completa delezione non porta a nessun fenotipo, mentre una mutazione attivante porta a DL. In tal caso, rimaneva comunque non ben chiaro perché i pazienti con ATS-DL presentassero breakpoints diversi nell'introne 2⁸⁰. Un'altra ipotesi è che la DL fosse secondaria ad un guadagno di funzione del gene *COL4A6* conferito da mRNA anomalo e/o dalla sintesi di una proteina anomala, tradotta da un trascritto tronco.

Per chiarire la patogenesi della DL, sono stati condotti studi su campioni tumorali di leiomiomi, ed in un paziente con ATS-DL è stato rilevato mRNA del gene *COL4A6* e tale trascritto è risultato includere l'esone 4 ma non l'esone 3, mentre gli studi di immunohistochemica hanno evidenziato che le catene $\alpha_5(IV)$ e $\alpha_6(IV)$ sono assenti nei

campioni tumorali¹⁸. Nei campioni tumorali derivanti da pazienti con ATS-DL, inoltre, sono stati evidenziati caratteristici cambiamenti nella composizione della matrice extra-cellulare, quali l'assenza della catena $\beta 1$ della lamina, della catena $\alpha 5$ dell'integrina ed una diminuita espressione della fibronectina¹⁸. Lo studio dei leiomiomi sporadici ha evidenziato da un lato l'assenza delle catene $\alpha 5(IV)$ e $\alpha 6(IV)$ e dall'altro le stesse modificazioni della matrice extra-cellulare evidenziate nei tumori dei pazienti con ATS-DL²⁸. Inoltre, l'analisi del DNA di un campione di leiomioma ha evidenziato una delezione della porzione terminale estesa dal *COL4A5* all'introne 2 del *COL4A6*²⁸. Questi risultati nel loro complesso indicano un meccanismo patogenetico comune per ATS-DL e i leiomiomi sporadici e conferma il ruolo della delezione compresa tra la regione inter-genica e l'introne 2 del gene *COL4A6* nel meccanismo di proliferazione muscolare²⁸.

Successivamente, dal confronto delle varie delezioni descritte in letteratura, è stata individuata una minima regione critica di 4,2 kb, che si estende dalla regione intra-genica, contenente il promotore dei geni *COL4A5* e *COL4A6*, all'introne 2¹⁷. Il ruolo del promotore contenuta in tale regione è stato studiato partendo dalla considerazione che i geni *COL4A5* e *COL4A6* sono ampiamente cotrascritti, però almeno a livello della MBG viene trascritto solo il gene *COL4A5*. Per tale motivo, si è supposto che vi siano meccanismi di regolazione della trascrizione per i due geni in parte differenziati. L'esame dettagliato della regione intergenica nei cheratinociti ha, in effetti, dimostrato l'esistenza di 2 promotori per i due trascritti alternativi del gene *COL4A6*, funzionalmente separabili dal promotore del *COL4A5* ed è stato identificato anche un elemento regolatore positivo, che può effettuare una regolazione coordinata. In conclusione, è stato individuato un potenziale ruolo della regione intergenica che agisce in modo gerarchico, come richiesto per spiegare una trascrizione cellula-specifica di questi geni⁸¹.

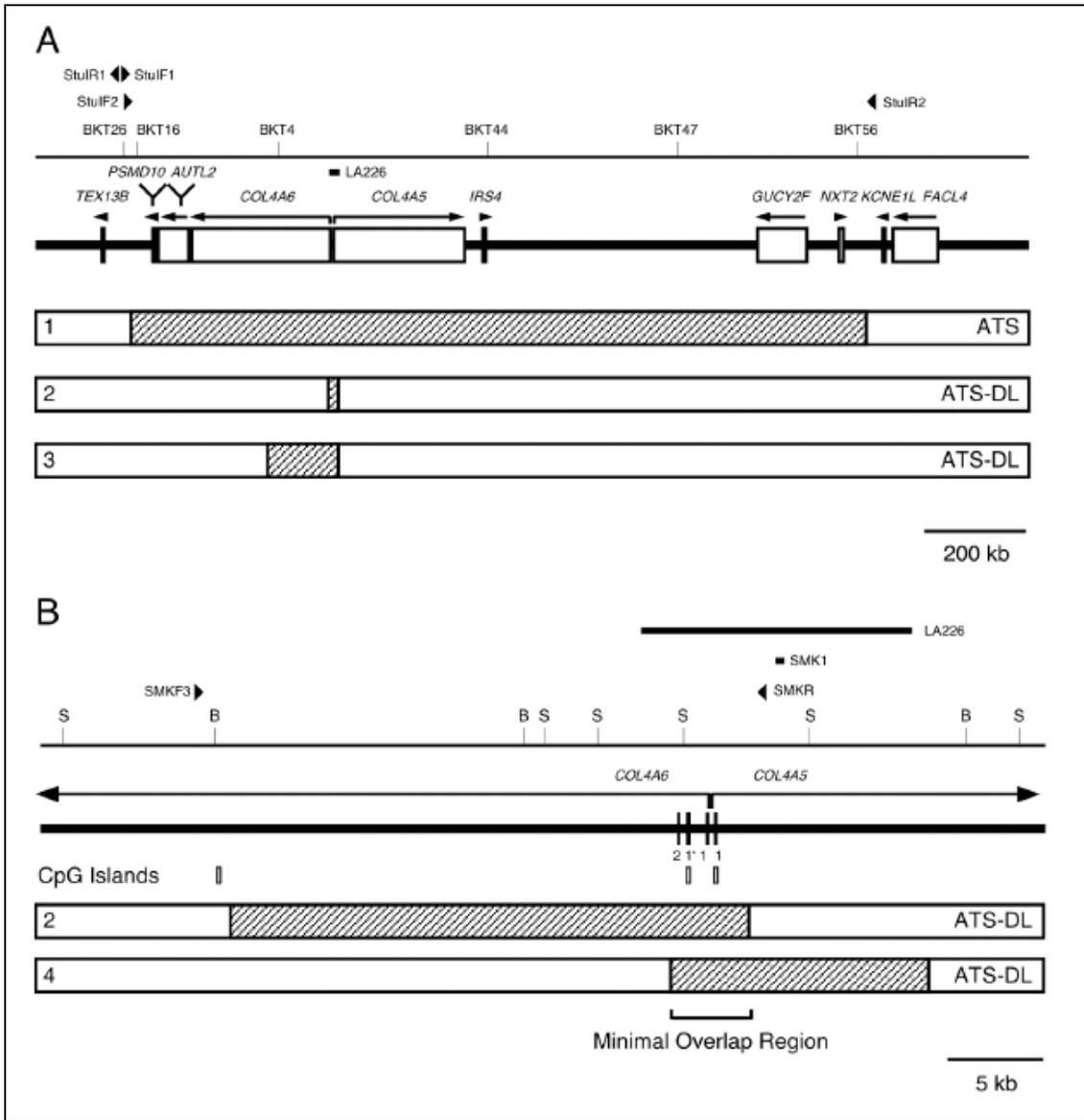


Figura 7 Mappa delle delezioni (modificata da Thielen BK, et al, 2003)

A: Overview delle delezioni B: Individuazione della minima regione di sovrapposizione

Le posizioni dei geni (in corsivo), degli STS, dei marcatori LA226 e SMK1, dei siti di restrizione BamHI (B) and SacI (S), dell'esone 1 del gene *COL4A*, degli esoni 1, 1' and 2 del gene *COL4A6* e delle CpG sono approssimative. I rettangoli riempiti con linee diagonali denotano le regioni dolete.

Parte A: la delezione 1 ha una dimensione di almeno 1,4 Mb, e coinvolge interamente i geni *COL4A5* e *COL4A*, come altri geni fiancheggiati, ed è associata ad ATS isolata. Le delezioni 2 e 3 hanno breakpoints prossimale variamente localizzato nell'introne 2 del gene *COL4A6* e breakpoint distale nell'introne 1 del gene *COL4A6*: sono entrambe associate a ATS-DL.

Parte B: la sovrapposizione di delezioni 2 e 3, con breakpoint più prossimale e distale, identifica una minima regione critica di 4,2 kb.

Negli anni, sono state, quindi, avanzate varie teorie per spiegare la patogenesi della DL. Una prima ipotesi suggeriva la presenza di un terzo gene localizzato nell'introne 2 del *COL4A6*, la cui completa delezione non porta a nessun fenotipo, mentre una delezione all'interno dell'introne 2 potrebbe portare a DL con un meccanismo di gain-of-function. In tal caso, rimane comunque non ben chiaro perché i pazienti con ATS-DL presentino breakpoints diversi nell'introne 2⁸⁰. Un'altra ipotesi è che la DL sia secondaria ad un guadagno di funzione del gene *COL4A6* conferito da mRNA anomalo e/o dalla sintesi di una proteina anomala, tradotta da un trascritto tronco, iniziata da uno degli ATGs trovato in frame nella sequenza di cDNA del *COL4A6*. Tale ipotesi rimane da verificare, anche se studi di immunistochemica hanno evidenziato che le catene $\alpha 5(IV)$ e $\alpha 6(IV)$ sono assenti nei campioni tumorali, mentre è presente l'mRNA del gene *COL4A6*¹⁸. Successivamente, sono state formulate ipotesi secondo cui la regione compresa tra l'introne 2 del gene *COL4A6* e la zona intra-genica potrebbe avere un ruolo nella regolazione della struttura della cromatina. Una delezione di tale regione potrebbe portare all'alterazione della regolazione dei geni circostanti in due modi. L'introne 2 potrebbe contenere un elemento silenziatore, che potrebbe operare in sintonia o in competizione con il promotore dei geni *COL4A5* e *COL4A6* nel muscolo liscio normale. In alternativa, la regione potrebbe fungere da insulator, stabilendo domini trascrizionali, all'interno dei quali i geni sono regolati in modo indipendente dall'influenza dei geni vicini. Tale modello sarebbe semplificato se la stessa regione del promotore agisse da insulator, e ciò sarebbe in accordo con la presenza di isole CpG nella regione intergenica¹⁷.

Attualmente, quindi, la patogenesi dell'ATS-DL rimane ignota. Nuove conoscenze che potrebbero aiutare nella comprensione di tale patologia potrebbero derivare dal sequenziamento dell'intera regione, che sarà disponibile a breve grazie alle tecniche di sequenziamento di nuova generazione⁸².

Alport syndrome and leiomyomatosis: description of three cases

Vera Uliana • Daniela D'Esposito • Elena Marcocci • Eleni Katzaki • Filomena Tiziana Papa • Ilaria Meloni • Claudia Izzi • Carlo Manno • Mirella Bruttini • Francesca Mari • Francesco Scolari • Alessandra Renieri • Leonardo Salviati

Abstract Alport syndrome (ATS) is a nephropathy characterized by the association of progressive hematuric nephritis with ultrastructural changes of the glomerular basement membrane (thinning, thickening and splitting), sensorineural deafness, and variable ocular abnormalities (anterior lenticonus, macular fleckes and cataracts). The most common mode of transmission is X-linked inheritance, due to *COL4A5* mutations. X-linked ATS is rarely associated with diffuse leiomyomatosis (DL), a benign hypertrophy of the visceral smooth muscle in gastrointestinal, respiratory and female reproductive tracts. The ATS-DL complex is due to deletions that encompass the 5' ends of the *COL4A5* and *COL4A6* genes and include the bidirectional promoter. In this paper, we described three ATS-DL cases, two familial and one sporadic, bearing the typical deletion encompassing 5'-end of both *COL4A5* and *COL4A6* genes, identified by MLPA analysis. Array-CGH technique allowed a better definition of deletion size confirming that the proximal breakpoint was within *COL4A6* intron II in two cases.

Keywords: Alport Syndrome • Diffuse Leiomyomatosis

V. Uliana · D. D'Esposito · E. Marcocci · E. Katzaki · FT Papa · I. Meloni · M. Bruttini · F. Mari · A. Renieri (✉)
Policlinico Le Scotte, Medical Genetics Unit, Department of Molecular Biology, University of Siena
Siena, 53100, Italy
e-mail: renieri@unisi.it

C. Izzi · F. Scolari ·
Division and Chair of Nephrology, Spedali Civili, University of Brescia, Italy

C. Manno
Renal, Dialysis and Transplant Unit, Department of Emergency and Organ Transplantation, University of Bari,

L. Salviati
Clinical Genetics Unit and Hematology-Oncology Laboratory, Department of Pediatrics, University of Padova, Italy

Introduction

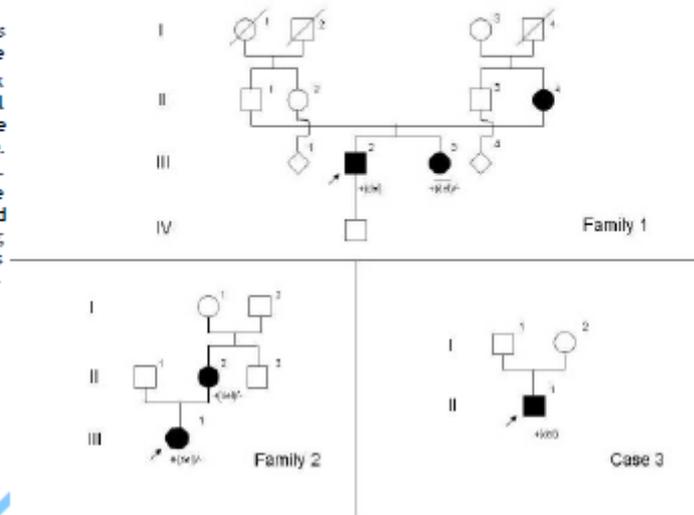
Alport syndrome (ATS) is a progressive heterogeneous nephropathy characterized by the association of progressive hematuric nephritis with ultrastructural changes of the glomerular basement membrane (thinning, thickening and splitting), sensorineural deafness and variable ocular abnormalities (anterior lenticonus, macular fleckes and cataracts).

ATS accounts for 1-2% of all patients who start renal replacement therapy in Europe, with an estimate frequency of about 1 in 5000^{1,2}. ATS is characterized by an alteration of the type IV collagen $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ network of the glomerular basement membrane (GBM). These proteins are encoded by three genes: *COL4A3* and *COL4A4* which are located head-to-head on chromosome 2, and *COL4A5* which is located on the long arm of the X chromosome, head-to-head with another type IV collagen gene, *COL4A6*, which encodes the $\alpha 6(IV)$ chain, not expressed in the GBM. *COL4A6* gene has been shown to contain two alternative first exons and a huge second intron (340 kb).

X-linked inheritance, due to *COL4A5* mutations, is the most common mode of transmission (XLAS, OMIM 301050). In this form, 70% of affected males reach end stage renal disease (ESRD) before 30 years (juvenile form), while only few cases (30%) progress toward ESRD after 30 years (rare adult form)³. The prognosis of X-linked ATS is usually regarded as favourable in females. Usually, microhematuria is the cardinal feature of the disease in females, although the risk of progression to end-stage renal disease appears to increase after 60 years of age⁴. The autosomal recessive (ARAS, OMIM 203780) and dominant forms (ADAS, OMIM 104200) of the disease are linked to mutations in the *COL4A3* and *COL4A4* genes and are reported in 10-15% of families in European countries⁵.

XLAS is sometimes associated with diffuse leiomyomatosis (DL), a benign hypertrophy of the visceral smooth muscle in gastrointestinal, respiratory and female reproductive tracts⁵. The esophageal wall

Fig 1 Pedigree of families. The figure represents the pedigree of family 1 (a), family 2 (b) and case 3 (c). □ Males, ○ females. Filled black symbols indicate individuals with a clinical diagnosis of ATS-DL. White symbols indicate individuals without clinical signs of the disease. An oblique bar indicates a deceased individual. The arrows indicate the index patients. The genotype at *COL4A5-COL4A6* locus is indicated below each symbol as follows: -, wild type allele; +, mutated allele. The type of mutation is indicated in brackets as del=deletion in *COL4A5-COL4A6* genes.



is typically involved and it causes dysphagia, post-prandial vomiting, retrosternal or epigastric pain since late childhood. Affected females typically exhibit genital leiomyomas, with clitoral hypertrophy and variable involvement of the labia majora and uterus. Bilateral cataracts also occur frequently in affected individuals². Periurethral and perirectal areas are involved less frequently⁶. The symptoms of leiomyomatosis are equally severe in females and males. This suggests that leiomyomatosis is fully expressed in females, with complete penetrance, in contrast to the manifestations of renal disease, which are in general more pronounced in men⁷.

In the literature, all patients with the Alport Syndrome –Diffuse leiomyomatosis (ATS-DL) complex have been found to have deletions that encompass the 5' ends of the *COL4A5* and *COL4A6* genes and include the bidirectional promoter^{5,6,8-17}.

Unlike the *COL4A5* breakpoint, whose position varies among different patients, the *COL4A6* breakpoint is consistently found within a relatively small segment of intron II^{5,14}. Interestingly, larger deletions, extending beyond intron II of *COL4A6* do not cause DL and only result in ATS¹⁸.

In this paper, we described three ATS-DL cases, two familial and one sporadic. MLPA analysis showed a deletion encompassing 5'-end of both *COL4A5* and *COL4A6* genes in the three cases. Array-CGH technique confirmed that the proximal breakpoint did not extend beyond intron II in all cases and permitted a better definition of size deletions.

Materials and methods

Genomic DNA isolation

Genomic DNA from normal male 46,XY and normal female 46,XX was obtained from Promega. Genomic DNA of the patients was isolated from an EDTA peripheral blood sample by using a QIAamp DNA Blood Kit according to the manufacturer protocol (Qiagen, www.qiagen.com). The Hoechst dye binding assay was used on a DyNA Quant™ 200 Fluorometer (GE Healthcare) to determine the appropriate DNA concentration.

MLPA analysis

The MLPA analysis was performed using two commercially available MLPA kits, namely SALSA P191/P192 Alport kits (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands; <http://www.mrc-holland.com>). The assay consists of two reaction mixes containing probes for 48 of the 51 *COL4A5* exons. Probes for exons 8, 25 and 40 are not included. In addition, probes for *COL4A6* exons 1, 1', and 2 are included. Details on probe sequences are available on the MRC-Holland web site (<http://www.mrc-holland.com>). This kit was previously tested on a series of patients with X-linked ATS and a patient with ATS-DL¹⁹.

Briefly, 100 ng of genomic DNA was diluted with TE buffer to 5 µl, denatured at 98°C for 5 minutes and hybridized with SALSA Probe-mix at 60°C overnight. Ligase-65 mix was then added and ligation was performed at 54°C for 15 minutes. The ligase was successively inactivated by heat 98°C for 5 minutes. PCR reaction was performed in a 50 µl volume. Primers, dNTPs and polymerase were added and amplification was carried out for 35 cycles (30 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C and 60 seconds at 72°C). The amplification products were separated on a ABI

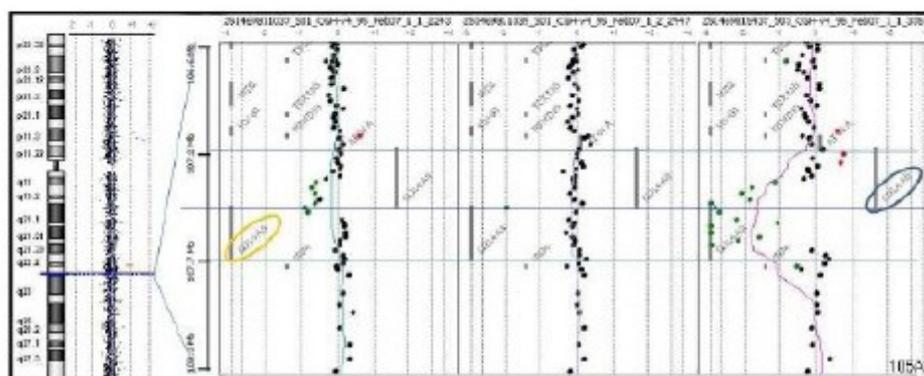


Fig 3 Molecular results. Array CGH ratio profile. On the left, the chromosome X ideogram. On the right, the log₂ ratio of chromosome X probes plotted as a function of chromosomal position. Oligos with a value of zero represent equal fluorescence intensity ratio between sample and reference DNAs. Each dot represents a single probe (oligo) spotted on the array. Copy number losses shift the ratio to the left and they are indicated for probands of family 2 (on the left), family 1 (in the middle) and case 3 (on the right).

proteinuria. A kidney-biopsy performed at 32 years showed diffuse mesangial thickening with focal segmental hypercellularity and diffuse podocyte hypertrophy. Interstitial fibrosis and atrophic tubuli were also reported. A diagnosis of focal segmental glomerulosclerosis was made. The ultrastructural analysis displayed irregular thickness of the GBM with lamellations and basket weaving lesions, compatible with a diagnosis of ATS. At the time of examination, urinary and blood analysis revealed microhaematuria, proteinuria (5,7 g/24h), normal creatinine clearance (126 ml/min) and serum creatinine (0,86 mg/dl).

The 30 year-old sister (III-3) presented dysphagia since childhood. At 9 years of age barium swallow revealed a grossly dilated and floppy esophagus with abnormal peristalsis. A diagnosis of achalasia was then suspected. Following further analysis, a distal esophageal leiomyoma that caused a narrowing of the esophagus was diagnosed and it was surgically removed. She also reported constipation since childhood. A rectosigmoidal endoscopy at 21 years resulted compatible with rectal aganglionosis and an histological examination of rectal biopsy at 24 years showed absence of the autonomic nervous system elements, confirming the diagnosis of Hirschprung disease. The gynaecologic examination revealed labia majora hypertrophy with subcutaneous cysts. She also presented rectal and vaginal prolapse. At the time of genetic counselling, urinary and blood analysis revealed microhaematuria, proteinuria and a normal serum creatinine (0,62 mg/dl). She did not refer hearing deficit, but she has never performed auditory testing. Ocular examination resulted normal, except for the presence of mild myopia.

The 57-year-old mother (II-4) referred achalasia surgically treated at the age of 9 years and hysterectomy for uterine leiomyomas at the age of 50

years. Urinary and blood analysis revealed microhaematuria, proteinuria and a mild increase of serum creatinine (1,42 mg/dl). She did not complain of hearing loss or ocular anomalies, but she has never performed auditory testing or an ophthalmologic examination.

Family 2 (DAM)

We described a proband and her mother with a history of nephropathy and leiomyomatosis (Figure 1b).

The 9-year-old female proband (III-1) presented microhaematuria, proteinuria (0,13 g/24h), gross haematuric events and a normal serum creatinine (0,6 mg/dl). The ultrastructural examination of a kidney biopsy performed at the age of 8 years revealed thickenings and lamellations of the GBM, compatible with a diagnosis of ATS. The audiological and ophthalmological examination resulted normal. Furthermore, esophageal leiomyomatosis was detected. The 39-year-old mother (II-2) presented microhaematuria, proteinuria (1 g/24h), gross haematuric events and normal serum creatinine. Esophageal and uterine leiomyomatosis was also diagnosed.

Case 3 (PIN)

The patient is a 20 year old male (II-1) with an unremarkable family history (Figure 1c).

Pregnancy, delivery and initial development were reported as normal. At age three, because of swallowing difficulties and post-prandial vomiting, he was diagnosed with esophageal achalasia. At age four, he was diagnosed with microhaematuria on a routine urine test. Routine auditory testing performed at age 6 showed initial sensorineural hearing loss, which progressively worsened and required hearing aids since age 11. Diffuse esophageal leiomyomatosis was

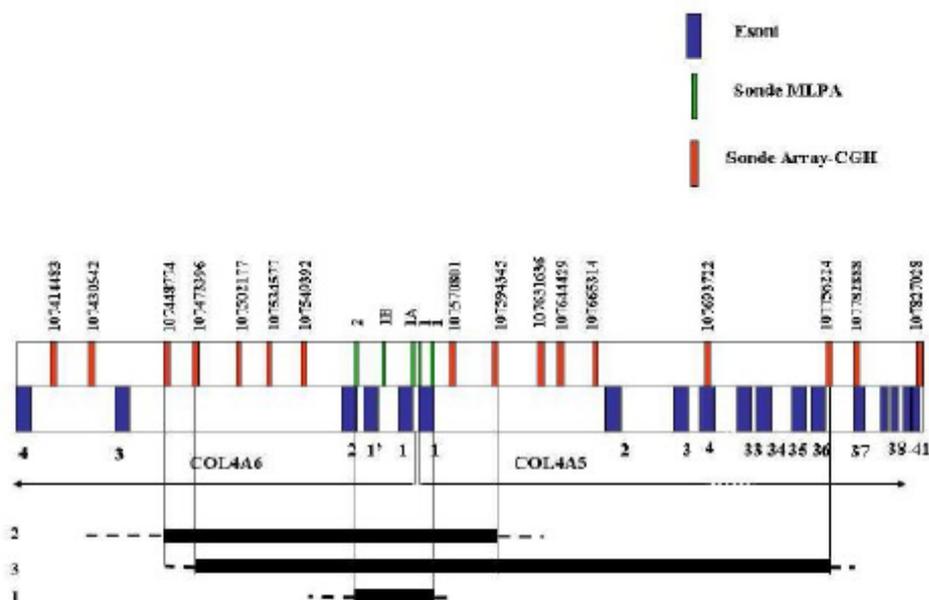


Fig 4 Deletions of the three ATS-DL cases. In the first line are indicated the genomic position of the MLPA and Array-CGH probes. In the second line, the blocks indicate the probes position. The black blocks represent the Array-CGH probes and we indicated the probes localized from COL4A6 exon 4 to COL4A5 exon 4, and then from COL4A5 exon 36 to 41. The gray blocks represent MLPA probe localized from COL4A6 exon 2 to COL4A5 exon 1: we do not report the others COL4A5 MLPA probes, while there are not other COL4A6 MLPA probes in SALSA P191/P192 Alport kits. In the third line, the white blocks indicate genes exons: exons 1-4 of the COL4A6 gene, exons 1-4 and 33-41 of the COL4A5. At the bottom of the figure, it is indicated the three cases: deletion.

diagnosed at age 9 during a follow up examination. He was referred to our service for genetic counselling at age 19. He had microhaematuria and proteinuria (1.4 g/day) and moderately elevated creatinine levels (1.38 mg/dL).

MLPA analysis

An MLPA analysis was used to ascertain the presence of a COL4A5-COL4A6 deletion in the three ATS-DL cases.

In family 1, the proband was found to bear a deletion of COL4A5 exon 1 and comprising COL4A6 exons 1, 1' and 2 (Figure 2). The deletion was found in heterozygous state in his sister (Figure 2).

The same MLPA result was obtained for the proband and her mother of family 2 (data not shown).

In case 3, a deletion of COL4A5 exons 1 through 36 was found to be extended into the COL4A6 gene and comprising COL4A6 exons 1, 1' and 2 (data not reported).

Array-CGH analysis

Oligonucleotide array-CGH with an average spatial resolution of approximately 25 Kb was performed on DNA of the three probands. The analysis of ratio

profiles revealed for cases 2 and 3 an interstitial deletion on the long arm of chromosome X.

Based on the array findings, the deleted region identified in the proband of family 2 consists of approximately 154 kb (46,XX del X(q22.3-22.3)). The proximal breakpoint is mapped in Xq22.3 (last oligonucleotide present located in 107.43 Mb, first deleted in 107.45 Mb position), while the distal breakpoint is located between 107.59 Mb and 107.63 Mb in Xq22.3 (last oligonucleotide deleted and first present, respectively) (Figure 3). The deleted region of case 3 is about 308 Kb in size (46, XX del X)(q22.3;q22.3). In this case, the proximal breakpoint is mapped in Xq22.3 (last oligonucleotide present located in 107.45 Mb, first deleted in 107.47 Mb position), while the distal breakpoint is located between 107.76 Mb and 107.78 Mb in Xq22.3 (last oligonucleotide deleted and first present, respectively). The array-CGH analysis of the male proband of family 1 resulted normal (46,XY) (Figure 3), showing that the deletion do not extend beyond COL4A6 intron 2 and COL4A5 intron 1 (Fig. 4).

Discussion

In this paper we report the application of MLPA and Array-CGH techniques to improve the definition of the *COL4A5-COL4A6* deletions in three ATS-DL cases.

We report three cases, two familial and one sporadic, with a clinical diagnosis of ATS-DL. Family 1 has an interesting history. The male proband presented ultrastructural features typical of ATS but a mild form of nephropathy, in fact at the age of 33 years he presented a normal renal function. Even if the nephropathy in males with ATS-DL is usually severe, men with a mild renal involvement have been previously reported¹⁶. Furthermore, the diagnosis of achalasia in his mother and Hirschsprung disease in his sister could represent a misdiagnosis of oesophageal and perirectal leiomyomatosis, respectively, as previously described^{6,17,21}.

Mechanisms of smooth muscle overgrowth in ATS-DL are unknown and cannot be explained simply by the loss of the $\alpha 5(IV)$ and $\alpha 6(IV)$ chains. All ATS-DL patients reported in literature present deletions extending from *COL4A5* gene to *COL4A6* intron II and including the bidirectional promoter^{5,11,14}. Since the proximal breakpoints invariably fall within *COL4A6* intron II and larger deletions extending beyond it do not cause DL and only result in ATS, this intron is considered the most important candidate region for the pathogenesis of the smooth muscle overgrowth in ATS-DL association^{5,18,22,23}. Different hypotheses have been proposed to explain this observation. It has been postulated that the *COL4A6* intron II contains a gene or a regulatory element, and that a deletion with breakpoints within intron II could give rise to smooth-muscle tumors by gain of function, in a manner abrogated by more extensive deletions^{14,15,17,18,24}. It has been also hypothesized that the partial deletion of *COL4A6* might cause a rearrangement of the gene eventually leading to overexpression of an alternative transcript in an inappropriate tissue leading to tumor development¹⁸.

Another interesting theory supposes that the region extending from intergenic region to intron II influences the expression of neighbouring genes through a modification of chromatin structure⁵.

In order to identify the deletions in our ATS-DL patients, MLPA analysis has been performed. As expected, a deletion encompassing 5'-end of both *COL4A5* and *COL4A6* genes was found in the three cases: two deletions (family 1 and 3) extending from *COL4A5* exon 1 to *COL4A6* exon 2 and one (case 3) from *COL4A5* exon 36 to *COL4A6* exon 2. Subsequently, for a better characterisation of the deletions especially at the 5' boundary, a 25 kb resolution array-CGH analysis has been performed. According to the literature data, the proximal breakpoints of the deletion associated with ATS-DL is localized within the huge *COL4A6* intron 2, about 127 kb in size, but the localization is variable. In family 2, the distal breakpoint is localized in the last 8.3 kb of *COL4A6* intron 2, in case 3 the distal breakpoint is located at a distance from *COL4A6* exon 3 included

between 33 to 24 kb, while in family 1 is localized in the first 18,4 kb of the *COL4A6* intron 2 (Figure 4).

In conclusion, we report three ATS-DL cases with the classical *COL4A5-COL4A6* deletion. Our data confirm that the ATS-DL association is caused by a deletion encompassing *COL4A5* and *COL4A6* genes, with distal breakpoints variably localized in *COL4A5*, causing ATS, and the proximal breakpoint localized in different part but invariably in *COL4A6* intron II. This data seems to confirm that *COL4A6* intron 2 is implicated in DL development. Moreover, the clinical history of our patients confirm that renal function and urinary status should be monitored in any patient with oesophageal leiomyomatosis. Conversely, the possibility of ATS-DL should be considered in ATS patients with dysphagia. ATS-DL is inherited as an X-linked trait and females with ATS-DL can be almost asymptomatic for ATS but they can transmit it. Therefore, when a molecular and clinical diagnosis of ATS-DL is made, a genetic counselling and screening for the relatives, in particular females one, is recommended.

Acknowledgements

This work was supported by a FIRB grant (RBIP00PMF2) to AR. The authors thank Prof. Loreto Gesualdo and Dr Anna Maria Di Palma immunohistochemical results on kidney biopsy obtained for family 1.

References

1. Flinter F. Alport's syndrome. *J Med Genet* 1997;34:326-30.
2. Kashtan CE, Michael AF. Alport syndrome. *Kidney International* 1996;50:1445-1463.
3. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F, Pirson Y, Verellen C, Wieslander J, Persson U, Tryggvason K, Martin P, Hertz JM, Schroder C, Sanak M, Krejcova S, Carvalho MF, Saus J, Antignac C, Smeets H, Gubler MC. X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:649-57.
4. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F, Pirson Y, Verellen C, Wieslander J, Persson U, Tryggvason K, Martin P, Hertz JM, Schroder C, Sanak M, Krejcova S, Carvalho MF, Saus J, Antignac C, Smeets H, Gubler MC. X-linked Alport syndrome: natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families: a "European Community Alport Syndrome Concerted Action" study. *Journal of American Society of Nephrology* 2003;14:2603-2610.
5. Thielen BK, Barker DF, Nelson RD, Zhou J, Kren SM, Segal Y. Deletion mapping in Alport syndrome and Alport syndrome-diffuse leiomyomatosis reveals

- potential mechanisms of visceral smooth muscle overgrowth. *Hum Mutat* 2003;**22**:419.
6. Guillem P, Delcambre F, Cohen-Solal L, Triboulet JP, Antignac C, Heidet L, Quandalle P. Diffuse esophageal leiomyomatosis with perirectal involvement mimicking Hirschsprung disease. *Gastroenterology* 2001;**120**:216-20.
 7. Van Loo A, Vanholder R, Buytaert I, De Paepe A, Praet M, Elewaut A, Lameire N. Alport syndrome and diffuse leiomyomatosis with major morbid events presenting at adult age. *Nephrol Dial Transplant* 1997;**12**:776-80.
 8. Zhou J, Gregory M, Hertz JMea. Mutations in the codon for a conserved arginine-1563 in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Kidney Int* 1993;**43**:722-729.
 9. Antignac C, Knebelmann B, Drouot L, Gros F, Deschenes G, Hors-Cayla MC, Zhou J, Tryggvason K, Grunfeld JP, Broyer M, Gubler MC. Deletion in the COL4A5 gene in X-linked Alport syndrome. *J Clin Invest* 1994;**93**:1195-1207.
 10. Dahan K, Heidet L, Zhou J, Mettler G, Leppig KA, Proesmans W, David A, Roussel B, Mongeau JG, Gould JM, et al. Smooth muscle tumors associated with X-linked Alport syndrome: carrier detection in females. *Kidney Int* 1995;**48**:1900-6.
 11. Heidet L, Dahan K, Zhou J, Xu Z, Cochat P, Gould JD, Leppig KA, Proesmans W, Guyot C, Guillot M, et al. Deletions of both alpha 5(IV) and alpha 6(IV) collagen genes in Alport syndrome and in Alport syndrome associated with smooth muscle tumours. *Hum Mol Genet* 1995;**4**:99-108.
 12. Heidet L, Cohen-Solal L, Boye E, Thorner P, Kemper MJ, David A, Larget Piet L, Zhou J, Flinter F, Zhang X, Gubler MC, Antignac C. Novel COL4A5/COL4A6 deletions and further characterization of the diffuse leiomyomatosis-Alport syndrome (DL-AS) locus define the DL critical region. *Cytogenet Cell Genet* 1997;**78**:240-246.
 13. Heidet L, Boye E, Cai Y, Sado Y, Zhang X, Flejou JF, Fekete F, Ninomiya Y, Gubler MC, Antignac C. Somatic deletion of the 5' ends of both the COL4A5 and COL4A6 genes in a sporadic leiomyoma of the esophagus. *Am J Pathol* 1998;**152**:673-8.
 14. Ueki Y, Naito I, Oohashi T, Sugimoto M, Seki T, Yoshioka H, Sado Y, Sato H, Sawai T, Sasaki F, Matsuoka M, Fukuda S, Ninomiya Y. Topoisomerase I and II consensus sequences in a 17-kb deletion junction of the COL4A5 and COL4A6 genes and immunohistochemical analysis of esophageal leiomyomatosis associated with Alport syndrome. *Am J Hum Genet* 1998;**62**:253-61.
 15. Segal Y, Peissel B, Renieri A, de Marchi M, Ballabio A, Pei Y, Zhou J. LINE-1 elements at the sites of molecular rearrangements in Alport syndrome-diffuse leiomyomatosis. *Am J Hum Genet* 1999;**64**:62-9.
 16. Mothes H, Heidet L, Arrondel C, Richter KK, Thiele M, Patzer L, Sado Y, Gubler MC, Antignac C, Scheele J. Alport syndrome associated with diffuse leiomyomatosis: COL4A5-COL4A6 deletion associated with a mild form of Alport nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2002;**17**:70-4.
 17. Anker MC, Armemann J, Neumann K, Ahrens P, Schmidt H, Konig R. Alport syndrome with diffuse leiomyomatosis. *Am J Med Genet A* 2003;**119A**:381-5.
 18. Heidet L, Dahan K, Zhou J, Xu Z, Cochat P, Gould JDM, Leppig KA, Proesmans W, Guyot C, Roussel B, Tryggvason K, Grunfeld J-P, Gubler MC, Antignac C. Deletions of both a5(IV) and a6(IV) collagen genes in Alport syndrome and in Alport syndrome associated with smooth muscle tumours. *Human Molecular Genetics* 1995;**4**:99-108.
 19. Hertz JM, Juncker I, Marcussen N. MLPA and cDNA analysis improves COL4A5 mutation detection in X-linked Alport syndrome. *Clin Genet* 2008;**74**:522-30.
 20. Pescucci C, Caselli R, Grosso S, Mencarelli MA, Mari F, Farnetani MA, Piccini B, Artuso R, Bruttini M, Priolo M, Zuffardi O, Gimelli S, Balestri P, Renieri A. 2q24-q31 deletion: report of a case and review of the literature. *Eur J Med Genet* 2007;**50**:21-32.
 21. Federici S, Ceccarelli PL, Bernardi F, Tassinari D, Zanetti G, Tani G, Domini R. Esophageal leiomyomatosis in children: report of a case and review of the literature. *Eur J Pediatr Surg* 1998;**8**:358-63.
 22. Vetrie D, Boye E, Flinter F, Bobrow M, Harris A. DNA rearrangements in the a5(IV) collagen gene (COL4A5) of individuals with Alport syndrome: further refinement using pulsed-field gel electrophoresis. *Genomics* 1992;**14**:624-633.
 23. Meloni I, Vitelli F, Pucci L, Lowry B, Tonlorenzi R, Rossi E, Ventura M, Rizzoni G, Kashtan CE, Pober B, Renieri A. Alport syndrome and mental retardation: clinical and genetic dissection of the contiguous gene deletion syndrome in Xq22.3 (ATS-MR). *J Med Genet* 2002;**39**:359-365.
 24. Antignac C, Zhou J, Sanak M, Cochat P, Roussel P, Deschenes G, Gros F, Knebelmann B, Hors-Cayla MC, Tryggvason K, Gubler MC. Alport syndrome and diffuse leiomyomatosis: deletions in the 5' end of the COL4A5 collagen gene. *Kidney Int* 1992;**42**:1178-1183.

3. MATERIALI E METODI

L'UOC Genetica Medica di Siena effettua come prestazione del sistema sanitario nazionale l'analisi molecolare per l'ATS.

Lo screening per la ricerca di mutazioni puntiformi viene effettuato per tutti e tre i geni implicati nell'ATS, *COL4A3*, *COL4A4* e *COL4A5*, tramite DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography). Quando viene evidenziato un profilo anomalo al DHPLC, si procede al sequenziamento automatico dello specifico amplicone.

La ricerca di delezioni nel gene *COL4A5* è stata recentemente semplificata grazie all'introduzione di un kit commerciale di MLPA con sonde in 48 dei 51 esoni del gene *COL4A5* e nei primi due esoni del gene *COL4A6*. Tale kit consente sia di ricercare grossi riarrangiamenti intra-genici nel *COL4A5*, responsabili di una parte delle forme X-legate di ATS, che delezioni responsabili di ATS-DL. Nei 3 casi di ATS-DL da noi recentemente descritti, a tale tecnica è stata affiancata la tecnica dell'Array-CGH ad una risoluzione di 25 kb. Tale tecnica è stata utilizzata a scopo di ricerca, allo scopo di una migliore definizione dei breakpoints, ma non è ovviamente proponibile in ambito diagnostico.

Tutte queste indagini vengono effettuate sul DNA del paziente, estratto da prelievi di sangue periferico (10 ml in EDTA) tramite QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen).

3.1 ANALISI DI MUTAZIONI PUNTIFORMI

3.11 PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica che permette l'amplificazione di specifici frammenti di DNA dei quali si conoscono le sequenze alle due estremità. Questa reazione avviene grazie alla capacità della DNA polimerasi di sintetizzare un filamento di DNA complementare ad una sequenza che utilizza come stampo. Per innescare la sintesi, ha bisogno di oligonucleotidi, i primers, che si appaiano al filamento stampo in corrispondenza delle estremità del frammento e funzionano da innesco della reazione.

Si utilizza, quindi, una mix contenente i primers, dei nucleotidi (dNTPS), i campioni di DNA ad una concentrazione di 100 ng/μl, la Taq polimerasi e i reagenti specifici per la reazione di PCR. Tale reazione prevede una denaturazione iniziale, seguita da 35 cicli costituiti da denaturazione (per aprire bene le due eliche di DNA), appaiamento (o annealing, alla temperatura specifica, che dipende dalla composizione in basi dei primers, per far appaiare i primers al filamento stampo) ed estensione (in cui la Taq-polimerasi si lega al primer e inizia a sintetizzare il nuovo filamento). Dopo i 35 cicli, viene effettuata una estensione finale e alla fine della reazione otteniamo circa un milione di copie del filamento iniziale di DNA.

3.12 DHPLC

La DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) è una tecnica di separazione ad elevata efficienza e sensibilità, che consente di caratterizzare differenti molecole in base a specifiche caratteristiche chimico-fisiche e steriche. La DHPLC impiega il meccanismo della ripartizione in fase inversa ad accoppiamento ionico⁸³.

Il sistema cromatografico è composto da due fasi: la fase solida o stazionaria, costituita da materiale di riempimento della colonna, e la fase liquida o mobile, costituita dal solvente che scorre attraverso la colonna. La fase stazionaria è costituita da microsferi di polystirene-divinilbenzene ed è elettricamente neutra e idrofobica, per cui i frammenti di DNA, contenenti ioni fosfato carichi negativamente, possono legarsi alla matrice della colonna solo con l'ausilio di una molecola ponte, il TEAA (TriEtilAmmonio Acetato). Il TEAA è una molecola carica positivamente con doppia funzionalità lipofila e idrofila, infatti, mentre la parte apolare della molecola interagisce con la fase stazionaria, la parte polare interagisce con il DNA. Il ruolo del TEAA è quello di circondare la molecola di DNA da analizzare e di farla interagire con la fase stazionaria. Il TEAA è aggiunto in basse quantità (0.1 M) nel tampone, in modo da essere costantemente disponibile.

Il principio su cui si basa la DHPLC è la differente interazione che le molecole da separare mostrano nei confronti del materiale cromatografico, sotto la modulazione chimica e meccanica dei tamponi. Il risultato è che il tempo di ritenzione in colonna dei frammenti, varia in funzione della qualità e quantità delle interazioni che essi stabiliscono con la fase stazionaria. Le molecole caratterizzate da un minor numero di interazioni vengono eluite più velocemente e viceversa. Quando un frammento di DNA è sottoposto ad analisi mediante DHPLC si possono verificare due situazioni:

- Nel caso in cui il frammento in esame non presenti mutazioni puntiformi, dopo un ciclo di denaturazione e successiva rinaturazione, si formeranno molecole di omoduplex, cioè molecole costituite da due filamenti perfettamente appaiati tra loro, in grado di instaurare un numero elevato di interazioni con la colonna, risultando quindi stabilmente legati ad essa. La presenza di molecole di omoduplex risulterà, all'analisi mediante DHPLC, in un unico picco di eluizione.
- Nel caso vi sia una mutazione puntiforme, dopo denaturazione e successiva rinaturazione, si formeranno oltre alle molecole di omoduplex, molecole di eteroduplex, costituite da due filamenti di DNA non perfettamente appaiati tra loro per la presenza di una "bolla" di mis-appaiamento nel punto della mutazione (Figura 1). La presenza di questa bolla rende meno stabile la molecola all'interno della colonna, in quanto diminuisce

il numero di interazioni tra il frammento e la fase stazionaria, quindi il tempo di eluizione sarà inferiore rispetto alle molecole di omoduplex. Di conseguenza se un frammento presenta una mutazione saranno visibili un picco alterato o più picchi aggiuntivi corrispondenti alle molecole di eteroduplex (Figura 1).

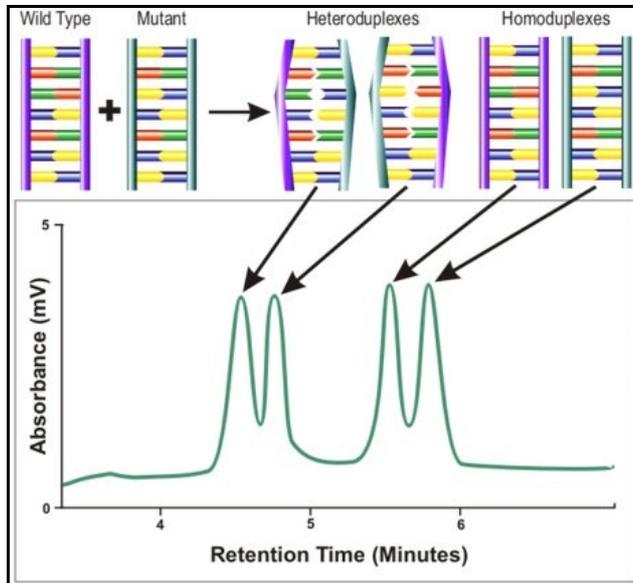


Figura 1 Principio della tecnica DHPLC
 Nella parte superiore della figura, è rappresentata la formazione delle molecole di omoduplex ed eteroduplex dopo denaturazione e successiva rinaturazione del DNA in presenza di una mutazione in eterozigosi. Nella parte inferiore della figura, sono rappresentati i quattro picchi che nel cromatogramma corrispondono alle molecole di omoduplex ed eteroduplex.

Per l'analisi al DHPLC il prodotto di PCR viene quindi denaturato a 95°C, rinaturato a 65°C per 10' e raffreddato a 4°C per favorire la formazione di eventuali eteroduplex. Le provette contenenti i prodotti di PCR possono essere poste direttamente nell'autocampionatore del sistema, che provvede a prelevare, in condizioni standard, 5 µl di amplificato (circa 20-50 ng di DNA) ed iniettarlo nel sistema per l'analisi.

Per ogni frammento è necessario calcolare la temperatura di melting (temperatura di "quasi denaturazione"), che verrà poi utilizzata per l'esame dei campioni. La temperatura di melting dipende da una serie di caratteristiche, tra cui la lunghezza del frammento e la sua composizione in paia basi, e viene calcolata da un apposito software (WaveMaker Software) che visualizza i domini contenuti nella sequenza e propone le temperature di analisi. Una volta scelta la temperatura di lavoro per ogni amplicone, si procede ad analizzare i campioni dello screening.

Per monitorare le separazioni ottenute in colonna si utilizza uno spettrofotometro corredato di microcella a flusso, dove l'eluuto passa in continuazione e ne viene effettuata la lettura all'ultravioletto a 260 nm. Il segnale di assorbanza viene tradotto in intensità (mV). Il risultato viene registrato dal PC e riportato sotto forma grafica nel cromatogramma.

3.13 SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO

I campioni con profili di eluizione alterati sono stati analizzati mediante sequenziamento automatico (Abi Prism 310, Applera) in modo da caratterizzare la mutazione.

La metodica del sequenziamento si basa sull'utilizzo, nella reazione di amplificazione, di una miscela di deossinucleotidi e di dideossinucleotidi trifosfato marcati con quattro fluorocromi distinti (ddNTP*). I ddNTP* sono privi del gruppo –OH in posizione 3'. Questa sostituzione fa sì che la DNA polimerasi, che richiede tale gruppo –OH per aggiungere il successivo nucleotide al filamento in crescita, non possa proseguire la sintesi del filamento.

La tecnica prevede l'allestimento di una miscela di reazione contenente il prodotto di PCR purificato utilizzando un kit di purificazione (Jet QUICK - Genomed), un primer specifico, deossinucleotidi, dideossinucleotidi marcati con 4 diversi fluorocromi e una DNA polimerasi termoresistente che permette la sintesi del nuovo filamento. Alla fine della reazione si otterranno una serie di frammenti di DNA di lunghezza diversa, terminanti tutti con un diverso dideossinucleotide marcato con uno specifico fluorocromo.

In seguito le sequenze vengono precipitate, in modo da ottenere la separazione completa dei frammenti di DNA, risospese in acqua e caricate all'interno del sequenziatore ABI310 (Applera), dove i campioni, separati elettroforeticamente, vengono letti da un laser che riconosce il dideossinucleotide marcato. Si ottiene così un cromatogramma nel quale ogni nucleotide è rappresentato da un picco di uno specifico colore: rosso per la Timina, verde per l'Adenina, blu per la Citosina, nero per la Guanina.

Le mutazioni si osservano confrontando una sequenza di un frammento wild-type con quella del nostro campione. Le mutazioni in omozigosi si evidenziano con un picco nella sequenza del campione di un colore differente rispetto a quello del picco corrispondente nella sequenza di controllo. Le mutazioni in eterozigosi, invece, si visualizzano con la presenza di due picchi sovrapposti di colore diverso.

3.2 ANALISI DI GROSSI RIARRANGIAMENTI

3.2.1 MLPA

La metodica MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) permette di rilevare i cambiamenti del numero di copie presenti nel DNA in esame. Il principio su cui si basa tale tecnica è l'amplificazione simultanea di sonde ibridizzate su regioni target. Ciascuna sonda MLPA è costituita da un oligonucleotide sintetico e un oligonucleotide derivato da DNA fagico M13.

L'oligonucleotide sintetico contiene una sequenza universale all'estremo 5' e una regione complementare alla sequenza target all'estremo 3' (Figura 2). L'altro oligonucleotide contiene una regione complementare alla sequenza target all'estremo 5', una sequenza sintetica detta *stuffer* di lunghezza variabile e una sequenza universale all'estremo 3' (Figura 2). In seguito all'ibridazione, i due oligonucleotidi vengono uniti dall'enzima ligasi. Dal momento che le sonde contengono estremità 3' e 5' universali possono essere amplificati contemporaneamente con una sola coppia di primers e in un'unica reazione di PCR. La sequenza *stuffer* fornisce una diversa lunghezza a ciascuna sonda (Figura 2).

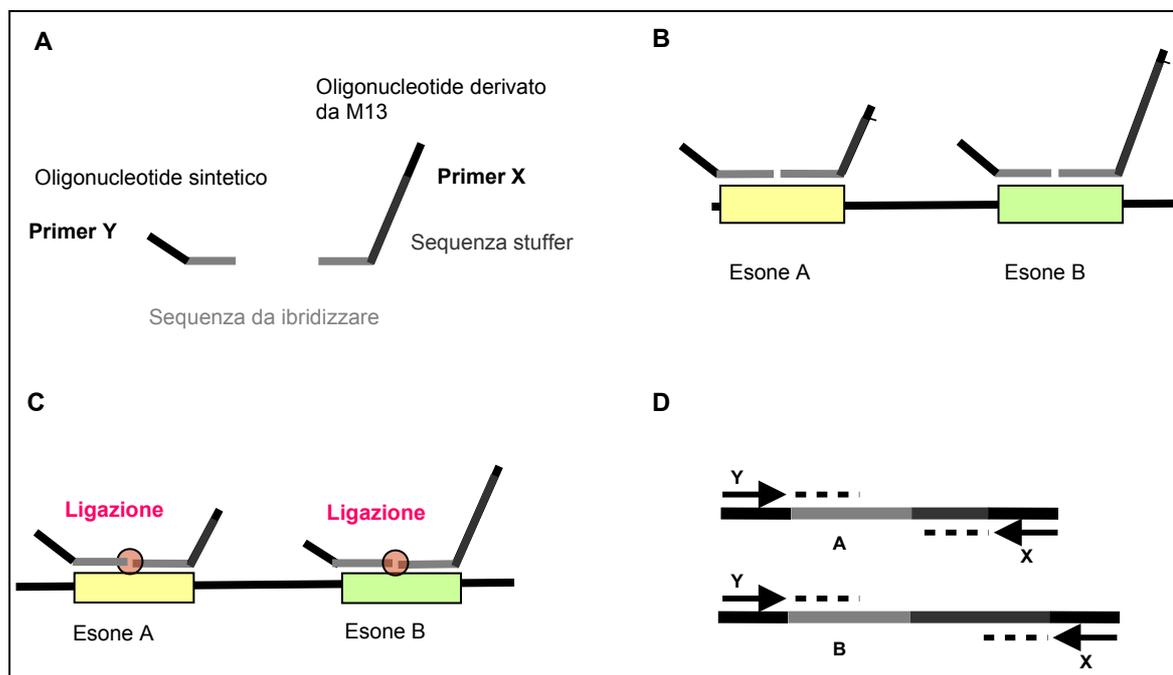


Figura 2 Principio della tecnica MLPA.

A) Rappresentazione schematica di una sonda MLPA. Gli oligonucleotidi sintetici contengono la sequenza riconosciuta dal primer universale Y (in nero), mentre il frammento derivato da M13 contiene la sequenza specifica per il primer universale X (in nero) e la sequenza stuffer (in grigio scuro). La sequenza target è indicata di grigio chiaro

B) Ibridazione della sonda MLPA con il DNA. Il DNA genomico è denaturato e le due parti di ogni sonda MLPA sono ibridizzate sulla sequenza di riferimento

C) Reazione di legazione. Solo le sonde perfettamente appaiate vengono legate da una ligasi termostabile

D) Reazione di PCR. Tutte le sonde legate sono amplificate tramite PCR utilizzando un'unica coppia di primers (X e Y). Il prodotto di amplificazione di ciascuna sonda ha una lunghezza caratteristica, per cui ciascun frammento è riconoscibile in seguito a separazione mediante elettroforesi capillare.

L'analisi del gene *COL4A5* è stato effettuata utilizzando il kit commerciale SALSA P191/P192 Alport kits (MRC Holland, Amsterdam, <http://www.mrc-holland.com>). Le sonde contenute in questi kit consentono di analizzare 48 su 51 esoni di *COL4A5* ed i primi 2 esoni del gene *COL4A6*.

L'analisi MLPA si compone di tre fasi: denaturazione-ibridazione, legazione e PCR⁸⁴.

Al termine di queste fasi, i campioni vengono caricati nel sequenziatore ABI-310 (Applied Biosystems) per la separazione dei frammenti e l'analisi tramite software Genescan. I dati vengono poi copiati su un file Excel (Microsoft) dove i risultati finali vengono calcolati tramite software "Coffalyser"(MRC Holland). Le alterazioni vengono considerate significative se il valori presentano una deviazione maggiore del 30% rispetto al controllo.

3.22 ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION

La tecnica Comparative Genomic Hybridization (ibridazione genomica comparativa) (CGH) è stata introdotta nel 1992 da Kallioniemi⁸⁵. Il principio della tecnica si basa su una ibridazione *in situ* modificata che sfrutta la competizione tra due campioni di DNA genomico (test e controllo), ibridati contemporaneamente in quantità equimolari su un vetrino su cui sono fissati cromosomi normali in metafase (CGH convenzionale) o sull'array su cui si trovano immobilizzate le sequenze omologhe di DNA (array-CGH). La tecnica di CGH convenzionale è una tecnica di rilevazione che consente di analizzare l'intero genoma del soggetto che si vuole esaminare, grazie ad un unico esperimento in grado di identificare anomalie del corredo genetico, quali riarrangiamenti sbilanciati, ovvero delezioni e duplicazioni cromosomiche. La tecnica di array-CGH, è stata sviluppata sostituendo i cromosomi delle metafasi di riferimento con una matrice su cui sono disposti (spottati) cloni BAC (cromosomi artificiali batterici), PAC (cromosomi artificiali di fago P1) o sequenze di oligonucleotidi, corrispondenti a loci specifici di ogni singolo cromosoma, fino a comprendere l'intero genoma umano. L'utilizzo di tali cloni, infatti, permette l'immediata correlazione tra l'eventuale alterazione sospettata in un paziente e una precisa posizione del riarrangiamento nel genoma, grazie alla scomparsa di un segnale corrispondente al clone contenente la sequenza deleta, o viceversa, all'aumento di segnale dovuto ad una duplicazione della sequenza. La risoluzione genomica dell'array-CGH dipende dalla lunghezza dei cloni utilizzati e dalla distanza tra un clone e l'altro. Pertanto, l'utilizzo di tali cloni permette di superare il limite principale della CGH convenzionale, che è la bassa risoluzione.

Nell'Array-CGH, si possono utilizzare diverse piattaforme, che si differenziano sostanzialmente per la grandezza delle sequenze genomiche disposte sull'array e per la copertura del genoma. I principi di base dell'array-CGH assomigliano a quelli dell'ibridazione genomica comparativa tradizionale. I campioni di DNA test e di controllo sono differenzialmente marcati, con fluorocromi rossi (Cy5) e verdi (Cy3), successivamente coprecipitati in presenza di Cot-1 DNA per bloccare le sequenze ripetitive e co-ibridizzati sull'array (Figura 3a). Si tratta di una competizione comparativa in cui si leggerà in proporzione più DNA da testare in ogni locus se maggiore sarà il numero di copie presenti in quel locus rispetto al numero di copie presenti nel DNA genomico di controllo. Viceversa se ne leggerà meno se minore sarà il numero di copie presenti in quel locus rispetto al numero di copie presenti nel DNA genomico di controllo. La fluorescenza è rilevata mediante uno scanner a laser (Figura 3b), grazie al quale si acquisisce un'immagine per entrambi i fluorocromi. In seguito, le immagini sono quantificate con metodo digitale mediante *software*

specifici, che quantificano l'intensità di fluorescenza emessa per ogni sonda (Figura 3c), calcolando quanto il rapporto tra i segnali emessi dal campione e dal DNA di riferimento devia dai valori attesi. Dato che le misurazioni possono essere riferite direttamente alle posizioni sul genoma, è possibile definire, con precisione, i punti di rottura (*breakpoints*) dei riarrangiamenti eventualmente presenti. La risoluzione dell'esperimento dipende dalla risoluzione dell'array. La sovrapposizione dei due segnali corrispondenti ai due fluorocromi, nel caso di un soggetto normale produce un valore di intensità di fluorescenza uguale a 1, poiché il rapporto tra i 2 fluorocromi $2/2$ è pari a 1. La rappresentazione grafica fornita dal *software* trasforma questo valore in logaritmo. Quindi i cloni in cui è avvenuta una normale ibridazione tra DNA di controllo e DNA test si trovano lungo la linea grafica dello 0. L'elaborazione finale del programma produce uno schema in cui è possibile vedere la distribuzione dei segnali di fluorescenza dei cloni nell'intorno del valore "zero" ad indicare una uguale dosaggio della regione del DNA test e del DNA di controllo. Cloni che si discostano da questa linea di "zero" verso $+0.58$, dove il rapporto tra i 2 fluorocromi è di $3/2$, sono indicativi di una regione duplicata e cloni che si discostano verso -0.80 , dove il rapporto tra i 2 fluorocromi è $1/2$, sono indicativi di una delezione. Si considerano possibili delezioni o duplicazioni quando si discostano dal valore di "zero" almeno 3 sonde (Figura 3d).

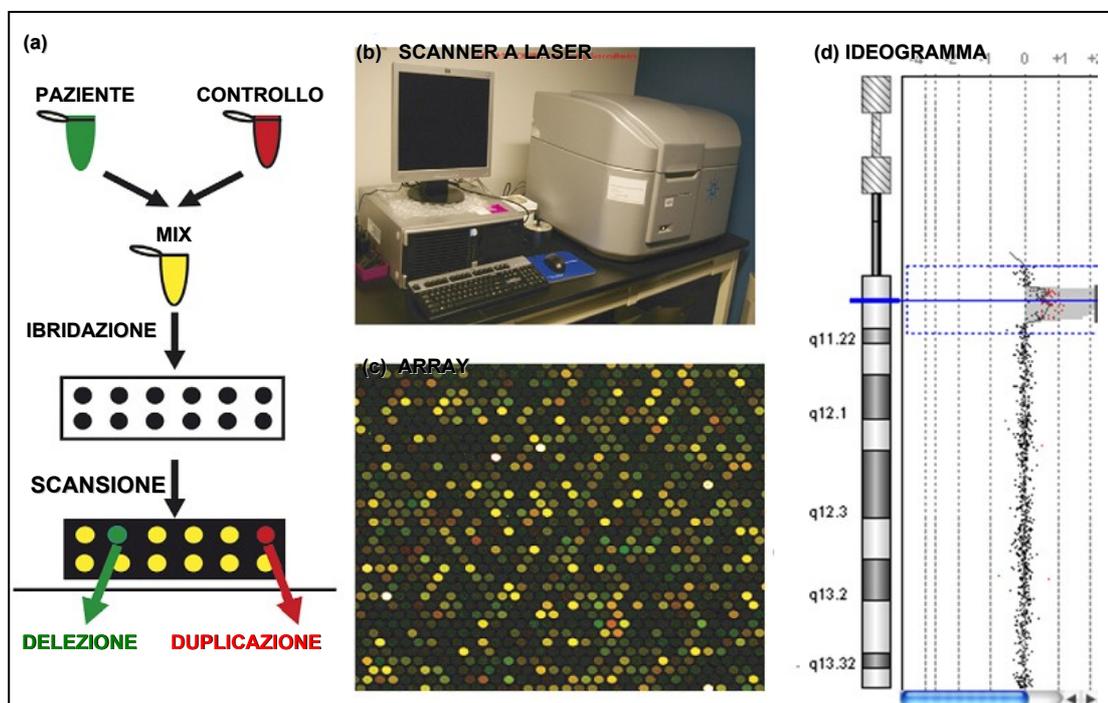


Figura 3 Rappresentazione schematica di un esperimento array-CGH.

(a) I DNA test e di controllo sono differenzialmente marcati, coprecipitati e ibridizzati su un array. Dopo le procedure di lavaggio, i vetrini sono analizzati attraverso uno *scanner* e (b) viene determinata l'intensità di fluorescenza di ogni sonda. (c) Dopo la trasformazione dell'immagine e la normalizzazione dei dati, i rapporti in \log_2 delle sonde sono tracciati come funzione della posizione cromosomica. Le sonde con un valore uguale a zero rappresentano un uguale rapporto dell'intensità della fluorescenza tra il test e il controllo. Ogni punto rappresenta una singola sonda individuata sull'array. (d) Ideogramma visualizzato dal *software*. La regione cromosomica appare duplicata poiché il rapporto di fluorescenza delle sonde presenti è di $3/2$.

4. CONSULENZA GENETICA NELLA ATS: ESPERIENZA PERSONALE

La Genetica Medica di Siena rappresenta il centro di riferimento in Italia per l'ATS. Dal 1991 al 1994 in Italia è stato effettuato uno Studio Multicentrico sulla ATS in modo da censire le famiglie italiane e raccoglierne i campioni biologici⁶⁷. Tale studio ha coinvolto centri di Nefrologia localizzati in tutta Italia, e da un lato ha permesso di far conoscere questa patologia, dall'altro ha dato la possibilità di effettuare l'analisi molecolare di tale patologia in Italia presso la Genetica Medica di Siena. Questo ha fatto sì che nel sospetto di ATS, il nefrologo riferisca il paziente per una consulenza genetica presso l'UOC Genetica Medica di Siena. Nel corso del periodo di specializzazione, ho partecipato a circa 70 consulenze per ATS, in 40 (57%) è stata ipotizzata una forma X-legata, in 7 (10%) una forma autosomica recessiva e in 23 (33%) una forma autosomica dominante o una TBMN ed in 1 (1,5%) è stata sospettata una ATS-DL. Di seguito, cercherò di riassumere il processo della consulenza di ATS e descriverò alcuni casi da me visti in consulenza.

La consulenza genetica viene richiesta da uno specialista, in genere il nefrologo, che pone il sospetto di ATS, e viene effettuata tramite la raccolta dell'albero genealogico e dell'anamnesi personale. Il consulente genetista, a questo punto, valuta l'appropriatezza del sospetto diagnostico e se è appropriato effettuare il test molecolare, ne discute insieme al paziente, spiegando il sospetto diagnostico ed il test genetico, ma anche i risvolti prognostici e terapeutici. La consulenza genetica per ATS è seguita dall'invio di una relazione che riassume il quadro clinico, contiene una breve spiegazione del sospetto diagnostico formulato e dell'analisi molecolare eventualmente avviata. Una volta terminata l'analisi molecolare vengono discusse le implicazioni dell'esito di tale indagine.

4.1 RECLUTAMENTO DEI PAZIENTI

I pazienti in genere vengono riferiti ad una consulenza genetica dallo specialista nefrologo, che pone il sospetto di ATS sulla base della storia del paziente e dell'esito della biopsia renale. La valutazione di una soggetto con sospetta ATS, comunque, coinvolge vari specialisti: nefrologo, anatomo-patologo, otorinolaringoiatra, oculista e genetista. Viene infatti effettuata una valutazione nefrologica, con ripetuti esami urine e studio della funzionalità renale, esame audiometrico, per valutare la presenza di ipoacusia neurosensoriale ed esame oftalmologico per ricercare le lesioni oculari descritte nella ATS. La biopsia renale ha poi un ruolo importante nella diagnostica della ATS: l'analisi al microscopio elettronico permette di evidenziare se sono presenti le tipiche lesioni ultrastrutturali dell'ATS e l'accuratezza di tale indagine viene aumentata se è disponibile lo studio immunostochimico per le catene del collagene di tipo IV.

Il paziente con sospetta ATS viene quindi indirizzato ad una consulenza genetica e telefona per un appuntamento presso la Genetica Medica di Siena. In tale occasione, viene richiesto brevemente il motivo della consulenza e viene indicato di portare tutta la documentazione disponibile e tutte le indagini effettuate. Inoltre, viene informato che verranno chieste informazioni relative alla sua famiglia, in particolare la familiarità per insufficienza renale o per ipoacusia e la presenza di anomalie all'esame urine nei parenti di primo grado.

4.2 CONSULENZA GENETICA

La consulenza genetica coinvolge sia probando che familiari. Uno dei setting tipici è quello in cui il consulente genetista si trova davanti un bambino con sospetta ATS, accompagnato da genitori ed eventuali membri affetti. Infatti, spesso la valutazione diagnostica inizia in seguito al riscontro di anomalie urinarie in un bambino, evidenziate casualmente durante dei controlli di routine o in seguito ad un episodio di macroematuria. Successivamente viene valutata se è presente o meno familiarità per microematuria e/o nefropatia, e vengono effettuati gli accertamenti del caso: valutazione della funzione renale, eventualmente biopsia renale, audiometria ed esame oculistico. A questo punto può emergere familiarità per nefropatia nel ramo materno ed in tal caso nella consulenza genetica può essere coinvolto un eventuale zio materno affetto o la nonna materna.

Una volta che il probando giunge in consulenza, uno dei punti centrali del processo è la raccolta della storia familiare, sotto forma di albero genealogico. Infatti essa fornisce un aiuto per raggiungere una corretta diagnosi e per determinare la prognosi. Nella ricostruzione dell'albero genealogico, viene posta particolare attenzione, oltre che alla familiarità per nefropatie, alle informazioni relative ad eventuali anomalie urinarie o ad ipoacusia, ad alterazioni rilevabili all'esame emocromocitometrico e ai valori della creatininemia dei familiari. Un'altra parte fondamentale della consulenza, è la raccolta della storia personale, effettuata in modo simile che nelle altre branche della medicina, considerando l'anamnesi patologica remota e prossima. Dato il sospetto specifico di ATS, vengono richieste in particolare informazioni relative alla presenza di microematuria, con relativa età di insorgenza, di proteinuria, di episodi di macroematuria, all'esito, qualora effettuate, di biopsia renale, di audiometria e di visita oculistica. In questi pazienti, va valutata la presenza di megatrombocitopenia all'esame emocromocitometrico, che ci indirizza verso una patologia legata alla *MYH9*. Mutazioni in tale gene, infatti, possono esitare in quadri clinici che per molti versi si sovrappongono alla ATS e si trasmettono con modalità autosomica dominante.

Nella raccolta della storia familiare e personale è di fondamentale importanza la visione diretta dell'esito dei reperti medici, quindi viene specificamente richiesto l'esito degli esami urine, sia del probando che dei familiari, l'eventuale referto della biopsia renale in uno degli affetti ed il risultato di un'audiometria. Infatti ad esempio la microematuria è considerata spesso un segno di scarso significato quindi spesso viene negata la presenza di anomalie all'esame urine nei familiari, perché non hanno mai fatto esami urine e perché i loro esami urine sono stati sempre riferiti come normali. Vedendo i referti può invece emergere la

presenza di microematuria, che nel sospetto di ATS in un familiare, può assumere significato ed aiutare nell'orientamento diagnostico. La raccolta dell'anamnesi familiare può inoltre far emergere elementi che possono indirizzarci su quale forma prendere in considerazione. Ad esempio la trasmissione maschio-maschio all'interno della famiglia ci fa escludere una forma X-legata, come nel caso 1 (pagine 72-74).

Lo studio ultrastrutturale ed l'analisi immunoistochimica delle catene del collagene IV sulla biopsia renale sono un ausilio diagnostico importante, ma a volte non disponibile. La biopsia renale, infatti, va effettuata quando il paziente presenta ancora una funzionalità renale conservata, perché nella fase successiva è pericolosa e mostrerebbe un quadro aspecifico di atrofia, ma non in fase troppo precoce, infatti in un bambino piccolo lo studio ultrastrutturale potrebbe evidenziare solo assottigliamento della MBG ed i reperti indicativi di ATS potrebbero comparire in seguito. La biopsia renale non è quindi disponibile ad esempio quando il probando/a, che non si è mai sottoposto a biopsia renale o essa è risultata non indicativa ad esempio per scarsità di materiale prelevato, presenta già insufficienza renale terminale o è già stato sottoposto a trapianto, oppure quando il probando/a è un bambino piccolo, in cui la biopsia renale sarebbe un esame troppo invasivo ed inoltre potrebbe aver maggiore significato dal punto di vista diagnostico e prognostico aspettare ad effettuare tale esame. In alcuni di questi casi, la biopsia cutanea potrebbe rappresentare un utile strumento diagnostico: in un bambino maschio con anomalie urinarie o un adulto sottoposto a trapianto renale un'alterata espressione della catene $\alpha 5(\text{IV})$ consente di orientare la diagnosi verso una XL-ATS, come nel caso 2 (pagine 75-79). La biopsia cutanea ha una sensibilità minore nelle femmine, anche se va segnalato che la sensibilità di tale tecnica è stata aumentata dalla recente introduzione della microscopia confocale. Ciò può essere utile ad esempio nei casi in cui le uniche affette sono donne con quadro non severo ed in cui, quindi, è difficile distinguere tra una forma autosomica dominante e una forma X-legata. In questi casi, il riscontro di un'alterata espressione della catena $\alpha 5(\text{IV})$ a livello cutaneo, non solo conferma l'ipotesi di ATS, ma orienta verso una XL-ATS. Quindi l'unica indagine molecolare da avviare è quella del gene *COL4A5*. A volte, l'analisi molecolare stessa può consentire di far diagnosi, ad esempio quando la biopsia renale è non disponibile e la biopsia cutanea non informativa, come nel caso 3 (pagine 80-84). In tali casi il riscontro di una mutazione patogenetica in uno dei geni responsabili di ATS, può confermare la diagnosi.

Nella consulenza genetica può emergere che è già stata fatta diagnosi di ATS in un familiare. In tal caso un elemento importante, da richiedere specificamente, è se sia già stata avviata o effettuata l'analisi molecolare per ATS, ed, eventualmente se è noto l'esito di tale

indagine. Inoltre, dato che la Genetica Medica di Siena è centro di riferimento per tale patologia è disponibile un database che contiene i dati di tutti i soggetti il cui materiale biologico è stato inviato per sospetta ATS con l'indicazione del tipo di indagine effettuate e l'esito. Quindi, è possibile fare un controllo crociato, valutando se presso il laboratorio della Genetica Medica è giunto il campione biologico di tale familiare. In tal caso, se viene dato il consenso per la condivisione dell'informazione sull'esito dell'indagine, è possibile abbreviare di molto i tempi di attesa della risposta. Infatti, se in qualche familiare è stata riscontrata una mutazione nei geni responsabili di ATS, viene ricercata solo tale specifica mutazione. Ciò oltre ad abbreviare i tempi di attesa dà una risposta di quasi certezza, in quanto si valuta semplicemente la presenza o l'assenza di una mutazione. Se invece l'analisi molecolare è risultata negativa, si evita di ripeterla nel nuovo familiare giunto in consulenza, perché si presuppone che in una famiglia in cui segrega la malattia, la mutazione responsabile della malattia sia la stessa in tutti i familiari.

4.3 INDICAZIONI FORNITE IN CONSULENZA GENETICA

Il consulente genetista una volta raccolta tutti i dati valuta se l'ipotesi di ATS è appropriata. In tal caso, a seconda dello specifico fenotipo clinico, si orienta verso una forma X-legata o una forma autosomica ed avvia lo specifico test genetico. L'analisi molecolare dei 3 geni coinvolti nella ATS viene effettuata mediante DHPLC e sequenziamento automatico per identificare le mutazioni puntiformi. Recentemente è stata introdotta la tecnica dell'MLPA per rilevare delezioni intrageniche nel *COL4A5* e nei primi 2 esoni del *COL4A6* e ciò permette da un lato di aumentare la sensibilità della diagnostica nella forma X-legata dall'altro di effettuare la diagnosi molecolare dell'ATS-DL.

Il consulente genetista, sulla base dei dati raccolti, può ritenere non appropriata l'ipotesi di ATS, ed in tal caso non viene avviata l'analisi molecolare di tali geni, come è avvenuto nel caso 4 (pagine 85-87). Inoltre, in consulenza genetica possono emergere elementi che orientano verso una diagnosi alternativa ed in tal caso può essere indicato avviare un'altra indagine molecolare. Tale decisione viene spiegata al paziente e viene riportata nella relazione inviata al paziente e allo specialista inviante. I casi in cui, il sospetto di ATS è considerato non appropriato sono molto pochi e spesso si ha una rivalutazione del caso tra consulente genetista e specialista inviante. A volte, in consulenza genetica non si arriva a una definizione diagnostica precisa ed in tal caso il consulente genetista può richiedere ulteriori indagini riservandosi di studiare il caso con più calma, parlandone con lo specialista inviante ed, eventualmente, con altri colleghi che si occupino di patologie rare. Questa è una peculiarità della consulenza genetica, che si occupa di patologie rare, ed è ancora più evidente nell'ambito di altri campi, quali quello della dismorfologia, in cui solo in una minoranza dei casi si arriva ad una diagnosi sindromica nel paziente, e si è soliti raccogliere materiale fotografico per poter sentire il parere di altri specialisti genetisti sullo specifico caso.

Ritornando alle consulenze per ATS, una volta raccolta la storia familiare e personale, presa visione della documentazione e, nella maggior parte dei casi formulata un'ipotesi diagnostica, il consulente genetista dà informazioni al probando ed ai familiari sulla ATS, in particolare sugli aspetti genetici, sulle diverse modalità di trasmissione e sul rischio di ricorrenza. Viene poi spiegato qual è il sospetto specifico e quali sono stati gli elementi che hanno portato a tale ipotesi. Il probando ed i familiari vengono informati su quale analisi molecolare è indicata e sui limiti della tecnica, che sono essenzialmente i lunghi tempi di attesa, per l'analisi di ogni gene si prevede un tempo non inferiore ai 12 mesi, ed il fatto che la sensibilità non è del 100%. Questo significa che nel caso venga riscontrata un'alterazione patogenetica il risultato conferma la diagnosi di ATS, ma nel caso in cui l'analisi molecolare

dovesse risultare normale, ciò non esclude la diagnosi di ATS. Infatti, si potrebbe trattare di un falso negativo, cioè uno di quei casi in cui l'alterazione è presente ma le tecniche a nostra disposizione non sono in grado di evidenziarla. Oppure, si potrebbe trattare di un riarrangiamento non visibile con le tecniche attualmente utilizzabili, ad esempio una delezione che coinvolge uno o più esoni dei geni coinvolti nelle forme autosomiche.

In conclusione, si accenna inoltre al fatto che attualmente non esistono presidi terapeutici specifici per la ATS. Nei soggetti con diagnosi di ATS, viene consigliato un adeguato controllo nefrologico, audiologico e oculistico, e viene attuata una terapia sintomatica in base agli eventuali sintomi e segni che si manifestano nel tempo. Nel corso del colloquio, ovviamente, viene lasciato spazio alle specifiche richieste del paziente, che riguardano essenzialmente rischio di ricorrenza, aspetti prognostici e terapeutici ed opzioni riproduttive.

Per quanto riguarda la risposta, convenzionalmente si avvisa il paziente che verrà inviata a casa: nel giro di qualche settimana verrà inviata una risposta preliminare, in cui verranno riassunti i punti affrontati in consulenza, invece la risposta dell'analisi molecolare richiederà non meno di 12 mesi. La risposta preliminare, a meno di richieste specifiche, viene inviata al paziente e allo specialista inviante, ed in essa viene brevemente spiegata la patologia e quale indagine viene avviata. Ricordiamo che i pazienti che giungono alla Genetica Medica di Siena per effettuare una consulenza genetica per sindrome di Alport provengono da tutta Italia, per cui spesso vi è una sola seduta di consulenza genetica ed eventualmente altri contatti telefonici. È molto importante, quindi, che il paziente e lo specialista ricevano dei resoconti delle indagini in corso.

4.4 RISPOSTA PRELIMINARE

Il probando ed i familiari presenti in consulenza, una volta ritornati a casa, ricorderanno solo in parte le informazioni fornite in consulenza. Infatti, la consulenza è un setting molto stressante, in cui vengono richieste e fornite molte informazioni, relative a questioni psicologicamente difficili da affrontare, quali la possibilità che “tare genetiche” possano essere trasmesse alle generazioni future. Per questi motivi e per il lungo tempo richiesto dall’analisi molecolare, è importante inviare una risposta preliminare poco dopo la consulenza. In tale risposta, vengono riassunte le caratteristiche cliniche familiari e personali, viene spiegato quale test si è deciso eventualmente di avviare e quali sono stati i motivi che ci hanno indotto a tale orientamento clinico. In genere, a meno che il probando non rifiuti il consenso, una copia della risposta viene inviata anche allo specialista inviante. Un punto molto importante che viene sottolineato in consulenza e nella risposta preliminare è il diverso rischio di ricorrenza nelle varie forme di ATS, che viene di seguito riassunto:

- Femmine portatrici di XL-ATS: i figli maschi presentano un rischio del 50% di essere affetti di XL-ATS, quindi di presentare una nefropatia grave con insorgenza in IRT in genere in età giovanile; le figlie femmine presentano un rischio del 50% di essere portatrici della patologia, quindi di presentare una nefropatia lieve, che può presentarsi con sole anomalie urinarie tutta la vita o con insorgenza di IRT in età più avanzata
- Maschi affetti da XL-ATS: i figli maschi saranno sicuramente sani e le figlie femmine saranno sicuramente portatrici di XL-ATS, quindi presenteranno una forma lieve di nefropatia
- Soggetti affetti da AR-ATS: tutti i figli saranno portatori di tale patologia, quindi presenteranno un quadro clinico lieve, in genere caratterizzato da microematuria isolata per tutta la vita, il rischio di ricorrenze dell’AR-ATS è molto basso, a meno di consanguineità con il partner
- Soggetti affetti da AD-ATS: vi è un rischio di ricorrenza del 50% di tale patologia nei figli, maschi e femmine

4.5 ESITO DELL'ANALISI MOLECOLARE

La risposta del test molecolare viene inviata al probando ed in copia al medico specialista inviante. Se la risposta è negativa viene inviata insieme ad una spiegazione in cui si indica anche se è utile proseguire o no con ulteriori indagini molecolari. Se, invece, l'analisi molecolare evidenzia una mutazione patogenetica, il paziente viene ricontattato e gli viene spiegato il significato della risposta che gli arriverà a casa. Spesso il probando ritorna in consulenza accompagnato da altri familiari per chiedere spiegazioni sull'esito di un'indagine avviata molto tempo prima. In tal caso, si spiega che il test genetico ha confermato nel probando la diagnosi di ATS e che ciò consente una veloce conferma diagnostica nei familiari. In essi, l'analisi richiede tempi modesti e dà una risposta sicura (presenza o assenza della mutazione), e potranno, quindi, vedere confermata od esclusa la diagnosi di ATS, senza ulteriori indagini strumentali.

L'identificazione della mutazione a livello familiare consente poi la diagnosi prenatale e in via teorica la fecondazione in vitro con selezione dell'embrione. In via teorica, in quanto quest'ultima tecnica ad oggi non è effettuabile in Italia. La diagnosi prenatale, nell'ambito della consulenza per ATS, viene considerata con cautela. Infatti si tratta di una malattia che insorge in epoca giovanile o adulta, non associata a ritardo mentale o malformazioni non compatibili con la vita. Inoltre, anche se attualmente non è disponibile una terapia specifica, è possibile una terapia sostitutiva. Si spiega, quindi, che dato che la diagnosi prenatale viene effettuata oggi tramite tecnica invasiva, con rischio di aborto anche se basso, va valutata essenzialmente nel caso in cui la donna pensa di interrompere la gravidanza di un feto affetto. Nell'ambito dell'esperienza clinica presso la Genetica Medica di Siena è stata applicata essenzialmente nel caso di XL-ATS. In tali casi è stato valutato il sesso del feto e solo nel caso di feto di sesso maschile si è proceduto alla ricerca della specifica mutazione presente nella madre. Non ho avuto esperienze di diagnosi prenatali per AR-ATS, anche se nel caso siano note le mutazioni nei due genitori teoricamente è possibile proporre tale indagine. La diagnosi prenatale non viene in genere proposta nella forma AD-ATS. Infatti il fenotipo renale in questo caso è difficilmente prevedibile ed il riscontro della mutazione potrebbe essere correlato ad una forma con sole anomalie urinarie per tutta la vita. Naturalmente il tutto viene discusso con la donna e/o con la coppia, sia al momento della spiegazione della risposta che nell'ambito dell'eventuale consulenza prenatale, in modo che sia presa una decisione consapevole.

4.6 CASI CLINICI

CASO 1 (PGN)

Probando: maschio, 47 anni. IRT dai 43 anni. In attesa di trapianto renale

RECLUTAMENTO DEL PAZIENTE: segnalato dalla Nefrologia di Siena. In seguito ad accertamenti effettuati per valutare la compatibilità per trapianto renale con le sorelle, è emerso una compatibilità HLA con la sorella quartogenita. Successivi accertamenti hanno evidenziato in lei la presenza di microematuria e proteinuria. La sorella è stata, quindi, sottoposta a biopsia renale e lo studio ultrastrutturale ha evidenziato caratteristiche suggestive di ATS. Arriva in sede di consulenza con un sospetto di XL-ATS, anche se l'età cui è comparso il deterioramento della funzione renale era avanzata rispetto a quella della tipica forma X-legata.

CONSULENZA GENETICA: La raccolta dell'anamnesi familiare (vedi albero genealogico in risposta preliminare) ha fatto emergere la presenza di costante microematuria nel figlio maschio del probando. Ciò ha portato ad escludere una forma X-legata ed a modificare il sospetto diagnostico da ATS X-legata ad ATS autosomica dominante.

INDICAZIONI FORNITE IN CONSULENZA GENETICA: il paziente è stato informato che l'analisi molecolare più appropriata era quella per ATS autosomica dominante. Sono state fornite informazioni relative a rischio di ricorrenza a livello familiare e qualche accenno alla prognosi, in base alle informazioni note, della forma autosomica dominante. A questo punto, per poter effettuare una migliore valutazione a livello familiare, sono stati consigliati ulteriori accertamenti al probando, in particolare esame oftalmologico ed audiometrico, ed ai familiari (riassunti nella risposta preliminare)

RISPOSTA PRELIMINARE: nella forma di seguito (pagine 73-74)

ESITO DELL'ANALISI MOLECOLARE: non ancora noto



Siena, XX-XX-XXXX

Consulenza Genetica n. XXXX

XXXXX
XXXXX
XXXXX

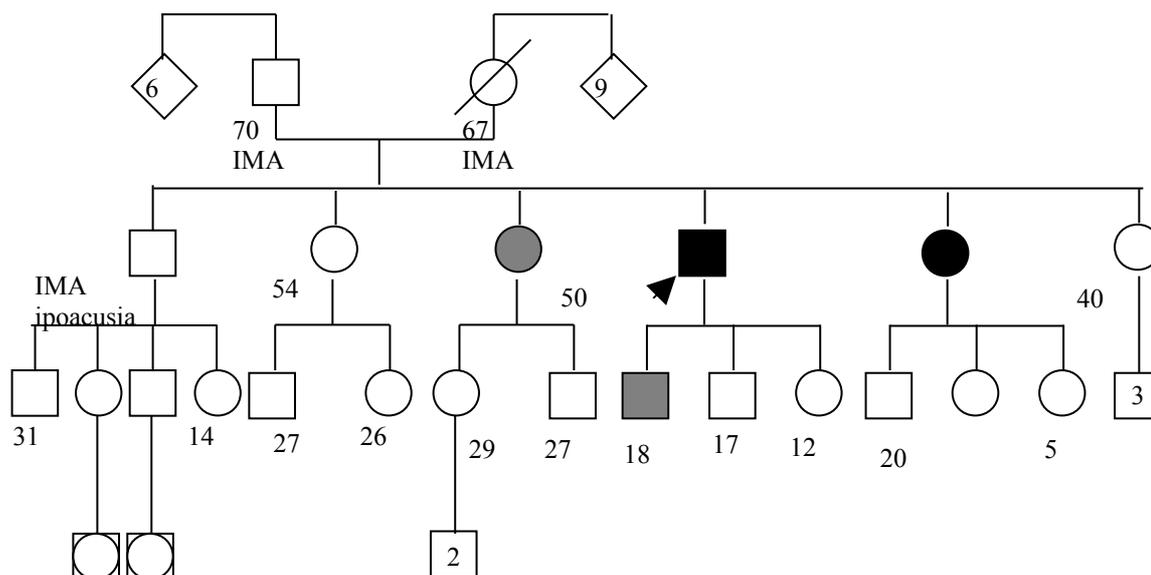
e p.c. XXXX
UOC Nefrologia
Siena

Motivo della consulenza: Il signor XXX e le sorelle, XXX e XXX, giungono in consulenza il XX-XX-XXXX, per sospetta sindrome di Alport (ATS).

Quadro clinico e anamnesi familiare: XXX, nato il XX-XX-XXXX, riferisce frequenti infezioni delle vie aeree in età infantile e cefalea dai 30 anni di età. A 43 anni, accertamenti effettuati per cefalea, hanno evidenziato ipertensione e aumento della creatininemia (2,7 mg/dl; v.n. 0,5-1,2 mg/dl). Il signor XXX ha iniziato terapia ipotensiva e dieta aproteica, e in seguito al progressivo deterioramento della funzionalità renale, è stato inserito in lista trapianti ed ha recentemente iniziato trattamento dialitico. Viene riportato che non ha mai effettuato esame audiometrico e che l'esame oculistico è risultato nella norma.

La sorella, XXX, di 44 anni di età, riferisce preeclampsia nella terza gravidanza e che da allora assume terapia ipotensiva. Controlli effettuati durante accertamenti per stabilire la compatibilità alla donazione di rene al fratello hanno evidenziato costante microematuria e proteinuria. Successivamente è stata sottoposta ad agobiopsia renale e lo studio ultrastrutturale ha evidenziato "assottigliamento ed ispessimento delle membrane basali".

All'anamnesi familiare emerge la presenza di microematuria nel figlio maggiore e in un'altra sorella, XXX di 50 anni, del signor XXX. Visioniamo esami delle urine della sorella secondogenita, XXX, di 54 anni, che risultano nella norma. L'albero genealogico mostra le seguenti caratteristiche:



Esami richiesti ed esito: è stato effettuato prelievo di sangue di XXX e delle sorelle, XXX e XXX. Sul DNA estratto di XXX è stata avviata l'analisi molecolare del gene *COL4A4*, responsabile insieme al gene *COL4A3*, delle forme autosomiche di ATS. Tale indagine richiederà tempi non inferiori ai 12 mesi.

Per una migliore definizione del quadro familiare, si consiglia di effettuare esame urine con la valutazione della funzionalità renale al padre, ai fratelli e ai figli dei fratelli del signor XXX.

Considerazioni:

La ATS è la più comune nefropatia ereditaria, caratterizzata da ematuria glomerulare di natura non immunologica con specifiche alterazioni delle membrane basali dei glomeruli renali, sordità di tipo percettivo e alterazioni oculari tipiche a carico della retina e del cristallino. Secondo le conoscenze attuali, la forma più comune di ATS si trasmette con modalità X-legata ed è causata da mutazioni nel gene *COL4A5*. In tale forma i maschi hanno prognosi più severa, con precoce insufficienza renale, mentre le femmine presentano in genere microematuria isolata.

Esistono inoltre altre due forme di ATS. Una forma, a trasmissione autosomica recessiva, è caratterizzata da una rapida progressione in insufficienza renale, sia nei maschi che nelle femmine. Un'altra forma, a trasmissione autosomica dominante, è caratterizzata da una lenta progressione in insufficienza renale, sia nei maschi che nelle femmine. Entrambe le forme autosomiche di ATS sono legate ai geni *COL4A3* e *COL4A4* e sono caratterizzate da un andamento clinico simile nei maschi e nelle femmine.

L'insieme del quadro clinico dei soggetti affetti, in particolare l'esito dello studio ultrastrutturale della biopsia renale in XXX e l'insorgenza in età adulta dell'insufficienza renale nel signor XXX, e dell'albero genealogico, in particolare la trasmissione maschio-maschio, che esclude una forma X-legata, tra il signor XXX ed il figlio, orientano verso una forma autosomica dominante di ATS. Per tale motivo è stata avviata l'analisi molecolare del gene *COL4A4*, responsabile insieme al gene *COL4A3*, di tale forma. Sarà nostra cura informarvi dell'esito di tale indagine, non appena conclusa.

Rimanendo a disposizione per eventuali chiarimenti

Cordiali Saluti

Il Medico
Dott.ssa Vera Uliana

Il Direttore
Prof.ssa Alessandra Renieri

CASO 2 (RUO)

Probando: maschio, 47 anni. IRT dai 15 anni di età.

RECLUTAMENTO DEL PAZIENTE: nel paziente era stato posto il sospetto diagnostico di ATS X-legata, ed il nefrologo aveva inviato presso il nostro istituto il materiale biologico del paziente. Successivamente, il paziente si era rivolto ad un centro per l'infertilità di coppia ed in tale occasione gli è stato consigliato di effettuare direttamente una consulenza genetica presso l'UOC Genetica Medica di Siena.

CONSULENZA GENETICA: all'anamnesi familiare emerge solamente la presenza di IRT nella madre, dai 48 anni di età.

INDICAZIONI FORNITE IN CONSULENZA GENETICA: è stata confermata l'ipotesi di ATS X-legata nel probando, spiegando che sarebbero occorsi altri mesi per la risposta. In consulenza, si è anche accennato alla possibilità di un falso negativo. Inoltre, si è spiegato che la biopsia cutanea avrebbe potuto fornire indicazioni diagnostiche.

RISPOSTA PRELIMINARE (inviata al paziente e ad al centro di Infertilità) nella forma riportata di seguito (pagine 76-77)

ESITO DELL'ANALISI MOLECOLARE: l'esito nella norma dell'analisi del gene *COL4A5* è stato inviato al paziente, al centro di infertilità ed al nefrologo che aveva inviato il campione biologico. Nella risposta definitiva, che riporto di seguito (pagine 78-79), è stato anche ribadito che un'indagine immunoistochimica per le catene del collagene di tipo IV su biopsia cutanea avrebbe potuto aiutare nell'orientamento diagnostico.

CONCLUSIONI: Il paziente è stato ricontattato ed ha deciso di effettuare la biopsia cutanea, che ha evidenziato assenza dell'espressione della catene $\alpha 5(IV)$. Ciò ha confermando l'ipotesi di XL-ATS. In questo caso, non è stata trovata l'alterazione molecolare alla base del quadro clinico, ma le varie indagini hanno permesso di arrivare ad un orientamento diagnostico. È stato possibile, quindi, rispondere al quesito specifico del probando riguardante il rischio di ricorrenza: gli eventuali figli maschi saranno sani e le eventuali figlie femmine portatrici di XL-ATS.



U.O. Genetica Medica Direttore Prof. Alessandra Renieri
Policlinico "Le Scotte" - viale Bracci - 53100 SIENA Tel. - 0577/585316-233303-233259
Fax 0577/233325 E-Mail: geneticamed@unisi.it - renieri@unisi.it

Siena, XX-XX-XXXX

Consulenza Genetica n. XXXX

XXXXX
XXXXX
XXXXX

e p.c. XXXX
XXXX
XXXX

Motivo della consulenza: Il signor XXX giunge in consulenza il XX-XX-XXXX, per sospetta sindrome di Alport (ATS). È presente anche la moglie, XXX.

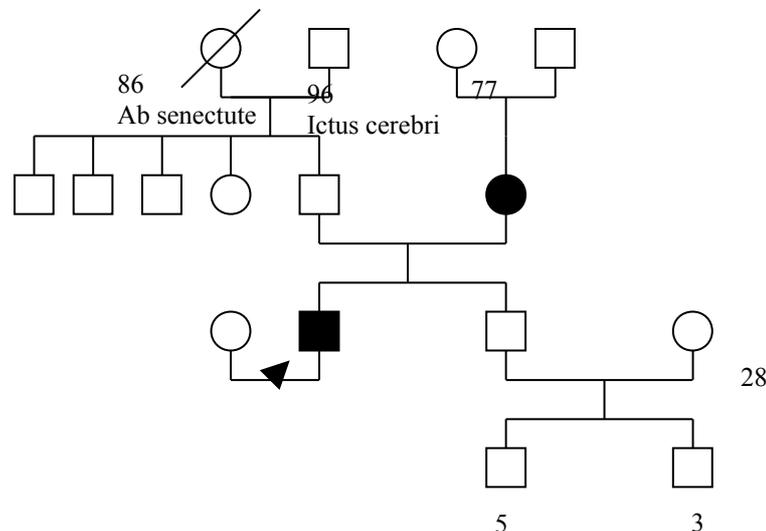
Quadro clinico e anamnesi familiare: XXX, nato il XX-XX-XXXX, presenta microematuria e proteinuria a partire dai 3 anni di età. A 15 anni di età, in seguito alla comparsa di astenia, anoressia, vomito, poliuria, polidipsia e calo ponderale e al riscontro di iperazotemia, ha iniziato a seguire dieta iposodica. A 16 anni di età, accertamenti hanno evidenziato grave insufficienza renale (creatininemia 13,5 mg/dl; v.n. 0,9-1,4 mg/dl) e deficit neurosensoriale pantonale bilaterale. Ha effettuato trattamento emodialitico fino ai 20 anni di età, quando è stato sottoposto a trapianto renale.

Il signor XXX e la moglie riferiscono di aver effettuato accertamenti per infertilità che hanno evidenziato anomalie allo spermioγραμμα nel signor XXX. Attualmente, il signor XXX e la moglie sono in attesa di FIVET.

Viene riferito riscontro di microematuria e proteinuria nella madre, XXX, a partire dai 19 anni di età. Una biopsia renale effettuata dalla signora XXX all'età di 22 anni ha evidenziato glomerulosclerosi focale di lieve entità, ma non è disponibile l'esame ultrastrutturale del campione. Viene riportato riscontro di insufficienza renale a 46 anni di età e successivo trapianto renale a 48 anni di età.

Sono risultati nella norma un recente esame urine del padre, del fratello, dei nonni materni e della moglie.

Non viene riferita consanguineità né tra i genitori né con il coniuge. L'albero genealogico mostra le seguenti caratteristiche:



Esami richiesti ed esito: Un prelievo di sangue del signor XXX era già giunto al nostro laboratorio, inviatoci dal Centro XXX. Sul DNA estratto, era stata avviata l'analisi molecolare del gene *COL4A5*, responsabile della forma X-legata di ATS. Si prevede che tale indagine sarà conclusa in circa 2 mesi.

Considerazioni:

La ATS è la più comune nefropatia ereditaria, caratterizzata da ematuria glomerulare di natura non immunologica con specifiche alterazioni delle membrane basali dei glomeruli renali, sordità di tipo percettivo e alterazioni oculari tipiche a carico della retina e del cristallino.

Secondo le conoscenze attuali, la forma più comune di ATS (circa il 90% dei casi) si trasmette con modalità X-legata ed è causata da mutazioni nel gene *COL4A5*. In tale forma i maschi hanno la prognosi più severa, progredendo in insufficienza renale in giovane età. Le femmine invece presentano nella maggior parte dei casi microematuria isolata, evidenziabile all'esame urine. Le femmine portatrici hanno un rischio del 12% di sviluppare insufficienza renale terminale entro i 40 anni di età, tale rischio, tuttavia, aumenta fino al 30% se considerato a 60 anni.

Esistono inoltre altre due forme di ATS. Una forma, a trasmissione autosomica recessiva, è caratterizzata da una rapida progressione in insufficienza renale, sia nei maschi che nelle femmine. Un'altra forma, a trasmissione autosomica dominante, è caratterizzata da una lenta progressione in insufficienza renale, sia nei maschi che nelle femmine. Entrambe le forme autosomiche di ATS sono causate da mutazioni nei geni *COL4A3* e *COL4A4*.

L'ipotesi di ATS è supportata sia dalla familiarità per insufficienza renale preceduta da precoce microematuria che dall'ipoacusia neurosensoriale presente nel signor XXX, anche se non è presente nessun referto ultrastrutturale di biopsia renale effettuata su uno degli affetti. L'insieme delle caratteristiche cliniche e dell'albero genealogico orientano verso una forma X-legata di ATS e, per tale motivo, è stata avviata l'indagine del gene *COL4A5*. Tuttavia non si può del tutto escludere la possibilità di una forma autosomica di ATS. Per un miglior orientamento diagnostico, si suggerisce di effettuare un'analisi di immunofluorescenza su biopsia cutanea (catena $\alpha 5$ del collagene tipo IV) che, in caso di positività, indicherebbe una ATS X-legata.

Nell'ipotesi di ATS X-legata, il rischio di ricorrenza in eventuali figli del signor XXX risulta assente nel caso di figli maschi, mentre le figlie femmine risulteranno sicuramente portatrici e quindi potranno presentare microematuria isolata o un quadro clinico sovrapponibile a quello della madre del signor XXX.

Rimanendo a disposizione per eventuali chiarimenti.

Cordiali Saluti

Il Medico
Dott.ssa Vera Uliana

Il Direttore
Prof.ssa Alessandra Renieri



U.O. Genetica Medica Direttore Prof. Alessandra Renieri
Policlinico "Le Scotte" - viale Bracci - 53100 SIENA Tel. - 0577/585316-233303-233259
Fax 0577/233325 E-Mail: geneticamed@unisi.it - renieri@unisi.it

Siena, XX-XX-XXXX

Consulenza Genetica n. XXXX

XXXXX
XXXXX
XXXXX

e p.c. XXXX
XXXX
XXXX

e p.c. XXXX
XXXX
XXXX
XXXX

A proseguimento della risposta inviata il XX-XX-XXXX

Sul DNA del paziente XXX XXX è stata effettuata l'analisi molecolare del gene *COL4A5*, responsabile della forma X-legata di sindrome di Alport (ATS). Tale indagine non ha evidenziato alterazioni patogenetiche (vedi allegato 1).

Poichè il risultato negativo dell'analisi effettuata non permette di escludere una forma X-legata di ATS e l'insieme delle caratteristiche cliniche e dell'albero genealogico non consentono un adeguato orientamento clinico, ed in particolare di escludere una forma autosomica di ATS, si segnala nuovamente che sarebbe utile effettuare una biopsia cutanea con studio immunostochimico delle catene del collagene di tipo IV. Sulla base dell'esito di tale indagine, siamo, inoltre, disponibili, ad effettuare l'indagine dei geni *COL4A4* e *COL4A3*, responsabile delle forme autosomiche di ATS.

Rimaniamo a disposizione per eventuali chiarimenti,

Cordiali Saluti,

Il Medico
Dott.ssa Vera Uliana

Il Direttore
Prof.ssa Alessandra Renieri



U.O. Genetica Medica Direttore Prof. Alessandra Renieri
Policlinico "Le Scotte" - viale Bracci - 53100 SIENA Tel. - 0577/585316-233303-233259
Fax 0577/233325 E-Mail: geneticamed@unisi.it - renieri@unisi.it

Allegato 1

Siena XX-XX-XXXX

Esito delle indagini molecolari eseguite in questo laboratorio su:

XXXX, campione n° XXXX

Motivo dell' esame: In data XX-XX-XXXX giunge presso il nostro laboratorio il campione di sangue di XXX per sospetta sindrome di Alport (ATS) X-legata.

Esame effettuato ed esito: Sul DNA di XXX sono stati analizzati 32 esoni mediante DHPLC e 19 esoni tramite SSCP del gene *COL4A5*, responsabile della forma X-legata della sindrome di Alport (ATS).

Non è stata rilevata alcuna alterazione.

Considerazioni: Il risultato negativo sul gene *COL4A5* non ci permette di escludere definitivamente che si possa trattare di ATS X-legata, poiché si rinvencono mutazioni solo nel 50% dei casi istologicamente accertati di ATS (Renieri et al. Am.J.Hum.Genet 58:1192-1204,1996).

Rimanendo a disposizione per qualsiasi chiarimento dei risultati.

Cordiali Saluti

Il Biologo

Dott.ssa Mirella Bruttini

Nota: nonostante l'accuratezza delle tecniche utilizzate, le indagini di laboratorio, inclusi gli studi sul DNA, non costituiscono un presidio diagnostico definitivo in tutti i casi e non sono esenti da possibilità di errore (falsi negativi e falsi positivi). Tali errori possono essere dovuti a scambio di campione e errori nella definizione del genotipo. Questi ultimi possono derivare da tracce di contaminazione nelle reazioni di PCR, da contaminazione materna di campioni fetali e da rare varianti genetiche che possono interferire con l'analisi.

CASO 3 (DFS)

PROBANDO: femmina, 34 anni. Microematuria, proteinuria e lieve ipoacusia.

RECLUTAMENTO DEL PAZIENTE: la paziente ha effettuato biopsia renale risultata suggestiva di ATS. Ha cercato informazioni su Internet ed ha trovato il numero dell'UOC Genetica Medica. Ha quindi chiamato per un appuntamento.

CONSULENZA GENETICA: all'anamnesi familiare è emerso che la madre presenta aumento della creatininemia ed ipoacusia neurosensoriale bilaterale che ha richiesto ausilio protesico dai 57 anni di età. La probanda era interessata soprattutto al rischio di ricorrenza.

INDICAZIONI FORNITE IN CONSULENZA GENETICA: la storia familiare e personale orientavano verso una ATS, anche se erano compatibili sia con una forma X-legata che con una forma autosomica dominante, infatti non vi erano maschi affetti in famiglia. La due forme presentano una prognosi molto diversa in eventuali figli della signora, ovviamente. Si è spiegato alla signora che per discriminare tra le due forme, avrebbe potuto essere utile effettuare studio di immunofluorescenza delle catene del collagene di tipo IV su biopsia cutanea, che nelle donne presenta comunque una sensibilità non elevata. È stato avviato l'analisi del gene *COL4A5*, responsabile della forma più frequente di ATS, quella X-legata.

RISPOSTA PRELIMINARE: riportata di seguito (pagine 81-82). In seguito, siamo stati contattati dalla probanda che ha effettuato la biopsia cutanea, risultata nella norma.

ESITO DELL'ANALISI MOLECOLARE: l'analisi molecolare ha evidenziato una mutazione nel gene *COL4A5* nella probanda, confermando lo stato di portatrice di XL-ATS. È stata inviata la risposta alla probanda, in cui, dato che il quesito principale era il rischio di ricorrenza, è stata accennata la possibilità di una diagnosi prenatale (pagine 83-84).

CONCLUSIONI: la probanda è stata ricontattata e gli è stato spiegato il significato della risposta inviata. In particolare il fatto che gli eventuali figli maschi presentano un rischio del 50% di essere affetti da XL-ATS. Per tale motivo, la signora in caso di gravidanza avrebbe riflettuto sull'eventualità di una diagnosi prenatale. Abbiamo proposto l'indagine ai familiari, in particolare alla sorella.

Esami richiesti ed esito: È stato effettuato un prelievo di sangue venoso alla signora XXX e sul DNA estratto è stata avviata l'analisi molecolare del gene *COL4A5*, responsabile della forma X-legata di ATS. Tale indagine richiederà un tempo non inferiore ai 12 mesi. Sarà nostra cura comunicarvi l'esito di tale indagine, non appena conclusa.

Considerazioni: La ATS è la più comune nefropatia ereditaria, caratterizzata da ematuria glomerulare di natura non immunologica con specifiche alterazioni delle membrane basali dei glomeruli renali, sordità di tipo percettivo e alterazioni oculari tipiche a carico della retina e del cristallino.

Secondo le conoscenze attuali, la forma più comune di ATS (circa il 90% dei casi) si trasmette con modalità X-legata ed è causata da mutazioni nel gene *COL4A5*. In tale forma i maschi hanno la prognosi più severa, progredendo in insufficienza renale in giovane età. Le femmine invece presentano nella maggior parte dei casi microematuria isolata, evidenziabile all'esame urine. Solo una percentuale minima di femmine portatrici presenta un quadro clinico più grave con progressione verso l'insufficienza renale.

Esistono inoltre altre due forme di ATS. Una forma, a trasmissione autosomica recessiva, è caratterizzata da una rapida progressione in insufficienza renale, sia nei maschi che nelle femmine. Un'altra forma, a trasmissione autosomica dominante, è caratterizzata da una lenta progressione in insufficienza renale, sia nei maschi che nelle femmine. Entrambe le forme autosomiche di ATS sono causate da mutazioni nei geni *COL4A3* e *COL4A4*.

L'ipotesi di ATS nella signora XXX è supportata dalla presenza di microematuria/macroematuria, proteinuria, dalla presenza di lievissimo deficit uditivo neurosensoriale ed in particolare modo dalle lesioni evidenziate alla biopsia renale. Le caratteristiche dell'albero genealogico non ci permettono di distinguere tra forma X-legata e forma autosomica. Tuttavia, dal momento che la forma X-legata di ATS è la più frequente, è stato deciso di avviare inizialmente l'analisi del gene *COL4A5*. Per aiutare a distinguere tra queste due forme, potrebbe essere utile un'analisi di immunofluorescenza su biopsia cutanea (catena $\alpha 5$ del collagene tipo IV), che, in caso di positività, indicherebbe una ATS X-legata.

Sia nel caso di ATS X-legata che di ATS autosomica dominante, la signora XXX presenta un rischio di ricorrenza della malattia in eventuali figli di circa il 50%. Tuttavia, si fa presente che, secondo le conoscenze attuali, i maschi con ATS X-legata hanno una prognosi più grave rispetto alle femmine con ATS X-legata e agli individui con forma autosomica dominante.

Rimanendo a disposizione per eventuali chiarimenti

Cordiali Saluti

Il Medico
Dott.ssa Vera Uliana

Il Direttore
Prof.ssa Alessandra Renieri



U.O. Genetica Medica Direttore Prof. Alessandra Renieri
Policlinico "Le Scotte" - viale Bracci - 53100 SIENA Tel. - 0577/585316-233303-233259
Fax 0577/233325 E-Mail: geneticamed@unisi.it - renieri@unisi.it

Siena, XX-XX-XXXX

Consulenza Genetica n. XXXX

XXXXX

e p.c. XXXX

XXXXX

XXXX

XXXXX

XXXX

A PROSEGUIMENTO DELLA RISPOSTA INVIATA IN DATA XX-XX-XXXX

Motivo della consulenza: La signora XXX giunge in consulenza il XX-XX-XXXX, per sospetta sindrome di Alport (ATS). È presente anche il marito, XXX.

Quadro clinico e anamnesi familiare: XXX, nata il XX-XX-XXXX, presenta microematuria, proteinuria e lievissima ipoacusia neurosensoriale a destra. Lo studio ultrastrutturale della biopsia renale è risultato suggestivo di ATS. Una biopsia cutanea per la valutazione dell'espressione del collagene di tipo IV, effettuata in seguito alla consulenza, è risultata nella norma.

All'anamnesi familiare emerge che la madre presenta incostante microematuria, creatininemia 1,32 mg/dl (v.n. 0-1,10 mg/dl) ed ipoacusia neurosensoriale bilaterale per cui utilizza ausilio protesico dai 57 anni di età.

Esami richiesti ed esito: sul DNA della signora XXX è stata effettuata l'indagine molecolare del gene *COL4A5*, responsabile della forma X-legata di ATS. Tale indagine ha evidenziato una mutazione in eterozigosi nella signora XXX (vedi allegato 1).

Considerazioni:

L'insieme delle caratteristiche cliniche e del risultato dell'analisi molecolare effettuata conferma che la signora XXX è portatrice di ATS X-legata, in quanto presenta una mutazione in eterozigosi nel gene *COL4A5*.

Le femmine portatrici di ATS X-legata presentano nella maggior parte dei casi microematuria isolata, evidenziabile all'esame urine. Le femmine portatrici hanno un rischio del 12% di sviluppare insufficienza renale terminale entro i 40 anni di età, tale rischio, tuttavia, aumenta fino al 30% se considerato a 60 anni.

La signora XXX, in caso di gravidanza, presenta un rischio di trasmettere tale mutazione agli eventuali figli del 50%. Ciò significa che i figli maschi avranno una probabilità del 50% di essere affetti da ATS X-legata, mentre le figlie femmine avranno una probabilità del 50% di essere portatrici di tale patologia, come XXX.

Si segnala che l'identificazione della mutazione del gene *COL4A5*, rende possibile, in caso di gravidanza e qualora richiesto, la diagnosi prenatale previo prelievo di villi coriali o amniocentesi. In tal caso, si prega di comunicare tempestivamente lo stato di gravidanza, al numero 0577-585316.

Rimangono a disposizione per estendere l'analisi ad altri familiari che ne facessero richiesta.

Cordiali Saluti

Il Medico
Dott.ssa Vera Uliana

Il Direttore
Prof.ssa Alessandra Renieri



Siena XX-XX-XXXX

Allegato 1

Esito delle indagini molecolari eseguite in questo laboratorio su :

XXX (campione n°XXX)

Motivo dell' esame: In data XX-XX-XXXX giunge presso il nostro laboratorio il campione di sangue di XXX per sospetta sindrome di Alport (ATS) X-legata.

Esame effettuato ed esito: Sul DNA di XXX sono stati analizzati 47 esoni mediante DHPLC e 4 esoni tramite SSCP del gene *COL4A5*, responsabile della forma X-legata di ATS.

L'analisi mediante DHPLC ha rilevato un profilo alterato nell'esone 49 del gene e la successiva analisi con il sequenziamento automatico di tale esone ha evidenziato la presenza in eterozigosi della mutazione puntiforme c.Q1582fsX1600 che determina lo slittamento della cornice di lettura del DNA, con conseguente comparsa di un codone di stop.

Considerazioni: L'insieme del quadro clinico e dell'esito dell'analisi molecolare conferma che XXX è portatrice della forma X-legata di ATS.

Il Biologo

Dott.ssa Mirella Bruttini

Nota: nonostante l'accuratezza delle tecniche utilizzate, le indagini di laboratorio, inclusi gli studi sul DNA, non costituiscono un presidio diagnostico definitivo in tutti i casi e non sono esenti da possibilità di errore (falsi negativi e falsi positivi). Tali errori possono essere dovuti a scambio di campione e errori nella definizione del genotipo. Questi ultimi possono derivare da tracce di contaminazione nelle reazioni di PCR, da contaminazione materna di campioni fetali e da rare varianti genetiche che possono interferire con l'analisi.

CASO 4 (CLC)

PROBANDO: Maschio, 8 anni, con malformazione urogenitale.

RECLUTAMENTO DEL PAZIENTE: il nefrologo ha ritenuto utile una consulenza genetica data la ricorrenza familiare di anomalie urinarie e malformazioni dell'apparato urogenitale, eventualmente anche nell'ipotesi di ATS.

CONSULENZA GENETICA: la storia personale e familiare non è risultata indicativa di ATS. L'analisi molecolare per tale patologia era inappropriata. È stata fatta una ricerca bibliografica ed è emerso che in letteratura erano descritte altre famiglie con ricorrenza di malformazioni dell'apparato urogenitale, a patogenesi non nota. Il quadro sembrava inquadrabile più in tale ambito e non era, quindi, disponibile alcuna analisi molecolare.

INDICAZIONI FORNITE IN CONSULENZA GENETICA: è stato spiegato che il quadro non sembrava inquadrabile in una forma di ATS, anche se nessuno degli affetti era stato sottoposto a biopsia renale. La ricorrenza di malformazioni dell'apparato genitale in famiglia comunque indicava un aumento rischio di ricorrenza di tali forme.

RISPOSTA: riportata di seguito (pagine 86-87)



U.O. Genetica Medica Direttore Prof. Alessandra Renieri
Policlinico "Le Scotte" - viale Bracci - 53100 SIENA Tel. - 0577/585316-233303-233259
Fax 0577/233325 E-Mail: geneticamed@unisi.it - renieri@unisi.it

Siena, XX-XX-XXXX

Consulenza Genetica n. XXXX

XXXXX
XXXXX
XXXXX

e p.c. XXXX
XXXX
XXXX

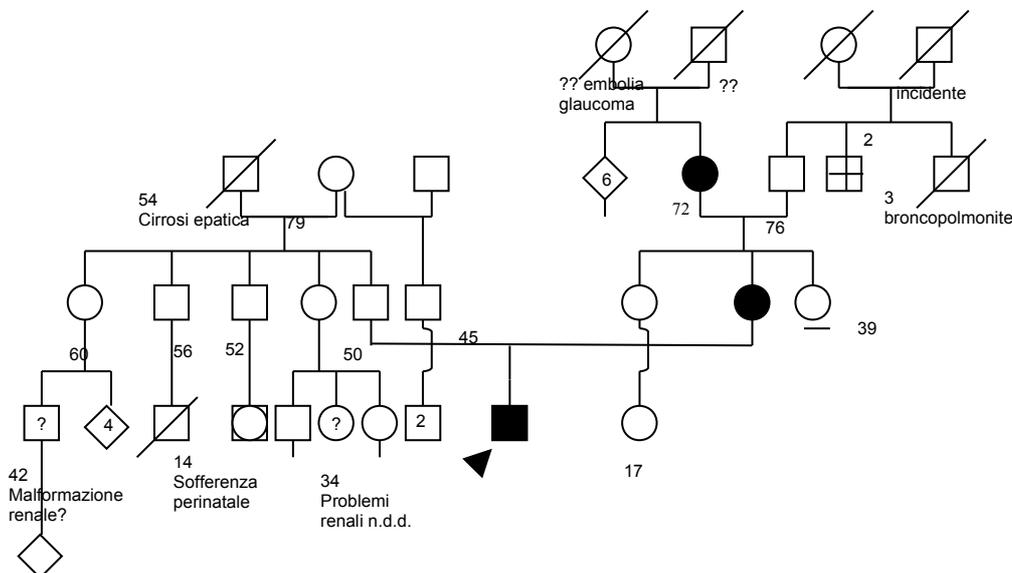
Motivo della consulenza: I signori XXX e XXX giungono in consulenza il XX-XX-XXXX, insieme al figlio, XXX, per sospetta sindrome di Alport (ATS).

Quadro clinico e anamnesi familiare: XXX, nato il XX-XX-XXXX, riferisce che ad 1 anno di età accertamenti effettuati per iperpiressia hanno evidenziato microematuria la presenza di valvole uretrali, escisse chirurgicamente, microematuria e calciuria. Un esame audiometrico è risultato nella norma. Recenti accertamenti hanno mostrato creatininemia nella norma (0,42 mg/dl; v.n. <1,20 mg/dl), microematuria e calciuria all'esame urine delle 24 ore, lieve incremento dell'ecogenicità renale ed ANA debolmente positivo (+, 1:160).

La madre, XXX, di 46 anni, riferisce microematuria congenita e, a 9 anni di età, è stato evidenziato "duplice distretto incompleto delle vie urinarie a sinistra con ricongiunzione degli ureteri a livello di L5 e di diverticolo ureterale a sinistra". Recenti accertamenti hanno evidenziato microematuria e creatininemia nella norma (0,6 mg/dl; v.n. 0,5-0,9 mg/dl).

La nonna materna, XXX di 72 anni, presenta insufficienza renale cronica in rene multicistico e stenosi bilaterale delle arterie renali. Viene, inoltre, riferita, la presenza di calciuria aumentata. Recenti accertamenti hanno evidenziato aumento della creatininemia (2,8 mg/dl, v.n. 0,5-0,9 mg/dl) ed ipertensione arteriosa. La signora XXX ha presentato distacco di retina bilaterale, intervento per cataratta ed una recente visita oftalmologica ha evidenziato retinopatia angiosclerotica e degenerazione maculare atrofica in occhio sinistro.

L'albero genealogico mostra le seguenti caratteristiche:



Considerazioni:

La sindrome di Alport (ATS) è la più comune nefropatia ereditaria, caratterizzata da ematuria glomerulare di natura non immunologica con specifiche alterazioni delle membrane basali dei glomeruli renali, sordità di tipo percettivo e alterazioni oculari tipiche a carico della retina e del cristallino. Secondo le conoscenze attuali, la forma più comune di ATS (circa il 90% dei casi) si trasmette con modalità X-legata ed è causata da mutazioni nel gene *COL4A5*. In tale forma i maschi hanno la prognosi più severa, progredendo in insufficienza renale in giovane età. Le femmine invece presentano nella maggior parte dei casi microematuria isolata, evidenziabile all'esame urine. Solo una percentuale minima di femmine portatrici presenta un quadro clinico più grave con progressione verso l'insufficienza renale. Esistono inoltre altre due forme autosomiche di ATS, legate entrambe ai geni *COL4A3* e *COL4A4*, con andamento clinico simile nei maschi e nelle femmine: una forma a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzata da una rapida progressione in insufficienza renale, e una forma a trasmissione autosomica dominante, caratterizzata da una lenta progressione in insufficienza renale.

XXX ha presentato valvola uretrale, una malformazione genitourinaria che si manifesta con infezioni urinarie ricorrenti e che è stata trattata endoscopicamente. La madre presenta bifidità ureterale, un'anomalia congenita delle vie urinarie caratterizzata da via escretrice renale divisa in due drenati ciascuno da un corrispondente uretere. La nonna materna presenta, infine, rene multicistico, una malformazione renale che può essere collegata ad impervietà della via escretrice.

L'insieme delle caratteristiche cliniche e dell'albero genealogico, in particolare la presenza di anomalie delle vie urinarie in Calcagno Angelo, nella madre nella nonna, rendono poco improbabile l'ipotesi diagnostica di ATS.

Si segnala che in letteratura sono descritte famiglie con ricorrenza di anomalie delle vie escretrici a trasmissione apparentemente autosomica dominante (*Aubert J, et al; Eur Urol, 2000; Sozubir S et al, Turk J Pediatric, 2005*). Ciò depone per un background genetico predisponente o causale di tali quadri clinici, anche se non sono ancora noti geni che, se mutati, causano tali anomalie. Nelle forme familiari, quindi, anche se non sono proponibili test genetici specifici, vi è un aumentato rischio di ricorrenza di anomalie delle vie urinarie.

Rimanendo a disposizione per eventuali chiarimenti

Cordiali Saluti

Il Medico
Dott.ssa Vera Uliana

Il Direttore
Prof.ssa Alessandra Renieri

CASO 5 (MRM)

PROBANDO: Maschio, 43 anni. IRC dai 40 anni.

RECLUTAMENTO DEL PAZIENTE: il nefrologo in base alla storia familiare e personale ed all'esito della biopsia renale ha sospettato una ATS. Ha così inviato il paziente in consulenza genetica.

CONSULENZA GENETICA: la storia clinica e la biopsia renale nel probando erano compatibile con ATS l'albero familiare ha evidenziato insufficienza renale in più generazione con gravità della malattia simile in maschi e femmine, senza nessun caso di IRT in età giovanile. Si è quindi sospettata una ATS autosomica dominante. Il probando ha due figlie gemelle (eterozigoti), entrambe con anomalie all'esame urine ed in una alla nascita era stata riscontrata tetralogia di Fallot.

INDICAZIONI FORNITE IN CONSULENZA GENETICA: si è spiegato al paziente che il sospetto era quello di una ATS autosomica dominante, con rischio di ricorrenza del 50%.

RISPOSTA PRELIMINARE: riportata di seguito (pagine 89-90)

ESITO DELL'ANALISI MOLECOLARE: è stata riscontrata una mutazione patogenetica nel gene *COL4A4* (risposta riportata di seguito, pagine 91-92). L'insieme del quadro clinico e dell'esito dell'analisi molecolare confermavano il sospetto di ATS autosomica dominante. A questo punto era possibile estendere l'analisi molecolare ai familiari.

CONCLUSIONI: Il probando è ritornato in consulenza con le figlie. L'analisi molecolare ha escluso la presenza di mutazioni nella figlia con tetralogia di Fallot ed ha evidenziato la mutazione nell'altra figlia. In questo caso, quindi, le anomalie urinarie riscontrate in modo intermittente in una delle figlie erano probabilmente dovute ad altra causa.



Siena, XX-XX-XXXX

Consulenza Genetica n. XXXX

XXXXX

XXXXX

XXXXX

e p.c. XXXX

XXXX

XXXX

Motivo della consulenza: Il signor XXX giunge in consulenza il XX-XX-XXXX per sindrome di Alport (ATS). È accompagnato dalla moglie, XXX.

Quadro clinico e anamnesi familiare: Il signor XXX è nato il XX-XX-XXXX a termine di una gravidanza normodecorsa,. Vengono riferite infezioni ricorrenti nella prima infanzia e riscontro di microematuria persistente a partire dai 15 anni. A 40 anni di età, è stata diagnosticata un'insufficienza renale cronica con creatinemia di 1,35 mg/dl (v.n. 0,70-1,30 mg/dl), clearance della creatinina di 66 ml/min (v.n. 80-120 ml/min) e proteinuria di 1,1 mg/die (v.n. 0-20 mg/dl). Vengono, inoltre, riscontrati valori ipercolesterolemia (321 mg/dl, v.n. 80-200 mg/dl), ipertrigliceridemia (508 mg/dl, v.n. 30-170 mg/dl) e tiroidite cronica, con funzionalità tiroidea normale, positività per anticorpi antitiroidei e tiroide multinodulare all'ecografia. Una recente biopsia renale ha dato il seguente esito: immunofluorescenza negativa, alla microscopia ottica "lesioni di lieve entità di prevalente coinvolgimento tubulo-interstiziale" e all'esame ultra-strutturale "modesta ipercellularità mesangiale e minimo aumento della matrice mesangiale, riduzione del lume capillare con lieve ispessimento della membrana basale in rare anse, presenza di globuli rossi nello spazio urinario". Un'audiometria effettuata quest'anno ha dato esito normale, mentre l'esame oftalmologico ha mostrato un lieve deficit visivo all'occhio destro.

Il signor XXX ha due figlie gemelle, nate al settimo mese di gestazione da parto eutocico. Una di esse è stata sottoposta ad intervento chirurgico per tetralogia di Fallot. Un recente esame urine evidenzia in entrambe una lieve proteinuria.

Il signor XXX riferisce che il padre, XXX, deceduto all'età di 68 anni, era in trattamento emodialitico da circa un anno. Viene riferito riscontro di microematuria persistente a partire dall'età di 40 anni. Esami del sangue e delle urine effettuati a 60 anni, avevano mostrato ipercolesterolemia (231 mg/dl; v.n. 120-200 mg/dl), ipertrigliceridemia (261 mg/dl; 50-200 mg/dl), proteinuria (30 mg/dl; v.n. assente) ed insufficienza renale (creatinemia 2,0 mg/dl, v.n. 0,6-1,3 mg/dl). Un'audiometria effettuata a 61 anni di età, ha evidenziato ipoacusia neurosensoriale bilaterale.

Il signor XXX riferisce che la madre, XXX, ha effettuato esami urine risultati nella norma. A 57 anni di età, un esame audiometrico della madre ha evidenziato ipoacusia neurosensoriale a destra.

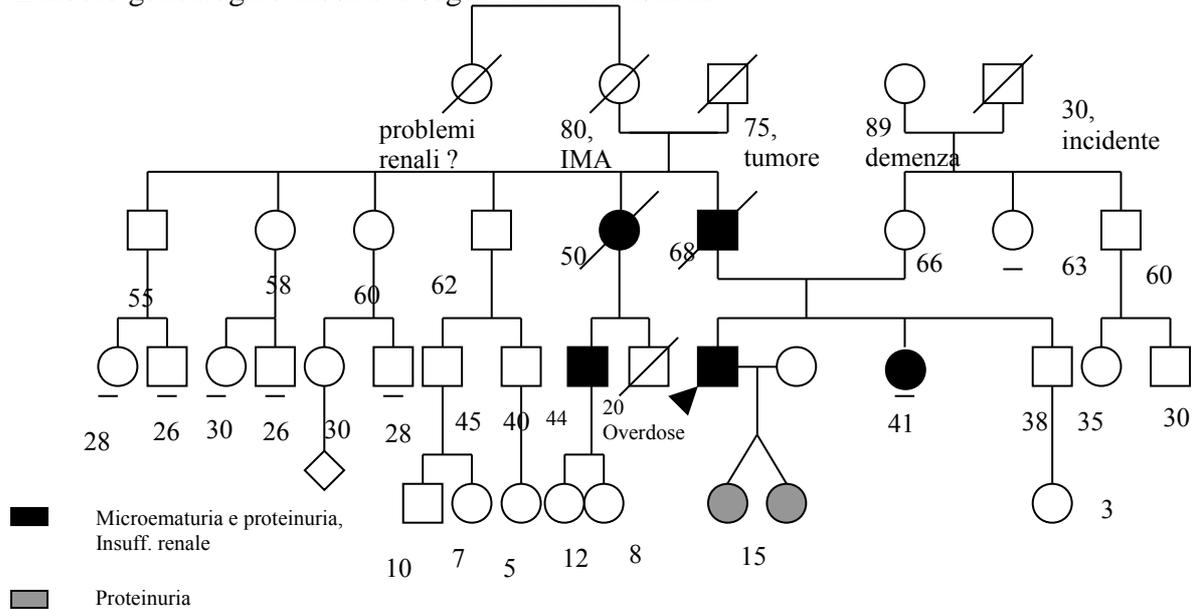
La zia paterna, deceduta a circa 50 anni, era in trattamento emodialitico da circa 4 anni. Viene riferito riscontro di microematuria persistente dai 20 anni di età.

La sorella, XXX, presenta costante micrematuria dai 15 anni di età. Esami urine effettuati a 39 anni evidenziavano microematuria (0,20 mg/dl) e proteinuria (30 mg/dl).

Accertamenti effettuati dal cugino paterno, XXX, a 26 anni di età hanno evidenziato microematuria e proteinuria, con funzionalità renale normale (creatinemia 0,90 mg/dl; v.n. 0-20 mg/dl). Recenti esami urine hanno confermato tale reperto.

Esami urine degli altri zii paterni sono risultati nella norma.

L'albero genealogico mostra le seguenti caratteristiche:



Esami richiesti ed esito: È stato effettuato un prelievo di sangue venoso nel signor XXX. Sul DNA genomico verranno analizzati i geni *COL4A3* e *COL4A4*, responsabili della forma autosomica di ATS. Tale analisi richiederà un tempo non inferiore a 12 mesi.

Considerazioni:

La ATS è la più comune nefropatia ereditaria, caratterizzata da ematuria glomerulare di natura non immunologica con specifiche alterazioni delle membrane basali dei glomeruli renali, sordità di tipo percettivo e alterazioni oculari tipiche a carico della retina e del cristallino. Secondo le conoscenze attuali, la forma più comune di ATS si trasmette con modalità X-legata ed è causata da mutazioni nel gene *COL4A5*. In tale forma i maschi hanno prognosi più severa, con precoce insufficienza renale, mentre le femmine presentano in genere microematuria isolata.

Esistono inoltre altre due forme di ATS. Una forma, a trasmissione autosomica recessiva, è caratterizzata da una rapida progressione in insufficienza renale, sia nei maschi che nelle femmine. Un'altra forma, a trasmissione autosomica dominante, è caratterizzata da una lenta progressione in insufficienza renale, sia nei maschi che nelle femmine. Entrambe le forme autosomiche di ATS sono legate ai geni *COL4A3* e *COL4A4* e sono caratterizzate da un andamento clinico simile nei maschi e nelle femmine.

L'insieme delle caratteristiche cliniche e dell'albero genealogico suggeriscono la diagnosi di sindrome di Alport autosomica dominante. Si segnala, inoltre, che l'associazione di dislipidemia e sindrome di Alport è stata precedentemente riscontrata in diversi soggetti affetti e che in letteratura è stata descritta una mutazione nel gene *COL4A4* in una famiglia con sindrome di Alport autosomica dominante ed ipercolesterolemia (Nephro Dial Transplant. 2001 Oct; 16(10): 2008-12). Per tale motivo, si ritiene opportuno avviare inizialmente l'indagine molecolare dal gene *COL4A4*.

Rimanendo a disposizione per eventuali chiarimenti

Cordiali Saluti

Il Medico
Dot.ssa Vera Uliana

Il Direttore
Prof.ssa Alessandra Renieri



U.O. Genetica Medica Direttore Prof. Alessandra Renieri
Policlinico "Le Scotte" - viale Bracci - 53100 SIENA Tel. - 0577/585316-233303-233259
Fax 0577/233325 E-Mail: geneticamed@unisi.it - renieri@unisi.it

Siena, XX-XX-XXXX

Consulenza Genetica n. XXXX

XXXXX

e p.c. XXXX

XXXXX

XXXX

XXXXX

XXXX

A completamento della risposta inviata in data XX-XX-XXXX

Motivo della consulenza: Il signor XXX giunge in consulenza il XX-XX-XXXX per sindrome di Alport (ATS). È accompagnato dalla moglie, XXX.

Esami richiesti ed esito: Il signor XXX presenta insufficienza renale cronica dai 40 anni di età, ipercolesterolemia ed esame audiometrico nella norma. Una recente biopsia renale era risultata compatibile con Sindrome di Alport.

È stata effettuata l'indagine molecolare del gene *COL4A4*, responsabile, insieme al gene *COL4A3*, delle forme autosomiche di ATS. Tale indagine ha evidenziato una mutazione in eterozigosi nel signor XXX (vedi allegato 1).

Considerazioni: L'esito dell'indagine molecolare effettuata conferma la diagnosi di ATS nel signor XXX. In particolare è risultato affetto dalla forma autosomica dominante di ATS. Le figlie del signor XXX presentano, quindi, un rischio di ricorrenza della patologia del 50%. Inoltre, poiché la sorella presenta microematuria e proteinuria, è probabile che sia anch'essa affetta da ATS.

Si segnala che sarebbe pertanto utile estendere l'analisi alla sorella, al fratello e alle figlie del signor XXX. Rimaniamo a disposizione per effettuare la ricerca della mutazione nei familiari che lo richiedessero (per informazioni telefonare al numero 0577-585316).

Cordiali Saluti

Il medico
Dott.ssa Vera Uliana

Il Direttore
Prof.ssa Alessandra Renieri



Siena, XX-XX-XXXX

Allegato n.1

Esito delle indagini molecolari eseguite in questo laboratorio sul paziente

XXX campione n. 2937

Sul DNA di XXX è stato indagato il gene *COL4A4* responsabile, insieme al gene *COL4A3*, delle forme autosomiche di sindrome di Alport, mediante la tecnica della DHPLC. L'analisi ha evidenziato nell'esone 22 del gene *COL4A4* la mutazione c.1579-1581delG (p.G527fs652X) in eterozigosi.

Il paziente XXX risulta affetto dalla forma autosomica dominante di sindrome di Alport.

A disposizione per qualsiasi chiarimento dei risultati

Cordiali Saluti

Il Biologo
Dott. Ilaria Longo

Nota: nonostante l'accuratezza delle tecniche utilizzate, le indagini di laboratorio, inclusi gli studi sul DNA, non costituiscono un presidio diagnostico definitivo in tutti i casi e non sono esenti da possibilità di errore (falsi negativi e falsi positivi). Tali errori possono essere dovuti a scambio di campione e errori nella definizione del genotipo. Questi ultimi possono derivare da tracce di contaminazione nelle reazioni di PCR, da contaminazione materna di campioni fetali e da rare varianti genetiche che possono interferire con l'analisi.



U.O. Genetica Medica Direttore Prof. Alessandra Renieri
Policlinico "Le Scotte" - viale Bracci - 53100 SIENA Tel. - 0577/585316-233303-233259
Fax 0577/233325 E-Mail: geneticamed@unisi.it - renieri@unisi.it

Siena, XX-XX-XXXX

Consulenza Genetica n. XXXX

XXXXX

e p.c. XXXX

XXXXX

XXXX

XXXXX

XXXX

Motivo della consulenza: Il signor XXX presenta diagnosi clinica e molecolare di sindrome di Alport (ATS) autosomica dominante (vedi risposta del XX-XX-XXXX). Il signor XXX ritorna in consulenza con le figlie, XXX e XXX, il XX-XX-XXXX. È presente in consulenza anche la moglie, XXX.

Quadro clinico e anamnesi familiare: XXX e XXX sono gemelle dizigoti, nate il XX-XX-XXXX. XXX presenta microematuria e lieve proteinuria intermittenti. XXX è stata trattata chirurgicamente per tetralogia di Fallot e un recente esame urine è risultato nella norma. In entrambe, il dosaggio della creatinina plasmatica è normale.

Esami richiesti ed esito: È stato effettuato un prelievo di sangue di XXX e XXX. Sul DNA di entrambe è stata effettuata ricerca specifica della mutazione p.G527fsX652 nel gene *COL4A4*, precedentemente identificata nel padre, XXX (vedi risposta del 11/05/2007). Tale mutazione è stata riscontrata in XXX, mentre è risultata assente in XXX (vedi allegato 1).

Considerazioni: L'insieme delle caratteristiche cliniche e dell'analisi molecolare indicano che XXX presenta una diagnosi di ATS autosomica dominante. Secondo le conoscenze attuali, tale forma di malattia, nella maggior parte dei casi, è caratterizzata da una lenta progressione in insufficienza renale, sia nei maschi che nelle femmine. Si consiglia un adeguato follow-up nefrologico in XXX.

Rimanendo a disposizione per eventuali chiarimenti,
Cordiali Saluti.

Il Medico
Dott.ssa Vera Uliana

Il Direttore
Prof.ssa Alessandra Renieri



Siena, XX-XX-XXXX

Allegato n.1

Esito delle indagini molecolari eseguite in questo laboratorio su:

XXX campione n. 3122

XXX campione n. 3123

Sul DNA di XXX e XXX è stata effettuata ricerca specifica tramite sequenziamento automatico della mutazione c.1579-1581delG (p.G527fsX652) nell'esone 22 del gene *COL4A4* riscontrata nel padre, XXX.

Tale mutazione è presente in eterozigosi in XXX (campione n. 3122), mentre è assente in XXX (campione n. 3123).

A disposizione per qualsiasi chiarimento dei risultati

Cordiali Saluti

Il Biologo
Dott. Ilaria Longo

Nota: nonostante l'accuratezza delle tecniche utilizzate, le indagini di laboratorio, inclusi gli studi sul DNA, non costituiscono un presidio diagnostico definitivo in tutti i casi e non sono esenti da possibilità di errore (falsi negativi e falsi positivi). Tali errori possono essere dovuti a scambio di campione e errori nella definizione del genotipo. Questi ultimi possono derivare da tracce di contaminazione nelle reazioni di PCR, da contaminazione materna di campioni fetali e da rare varianti genetiche che possono interferire con l'analisi.

CASO 6 (PZZ)

PROBANDO: maschio, 37 anni. Microematuria e proteinuria. Ipoacusia neurosensoriale trattata con protesi dai 12 anni, iniziale cheratocono e lenticono bilaterale.

RECLUTAMENTO DEL PAZIENTE: il nefrologo che lo vede per programmare biopsia renale, sospetta ATS e viene inviato in consulenza.

CONSULENZA GENETICA: il probando presentava compromissione oculare ed uditiva grave e modesto coinvolgimento renale (assenza di IRC a 37 anni). La storia familiare ha evidenziato consanguineità tra i genitori. Gli elementi in nostro possesso, nel caso si trattasse di ATS, facevano propendere per una forma recessiva, se non fosse che la compromissione renale era molto meno grave che quanto in genere descritto nell'ATS autosomica recessiva. Abbiamo deciso di aspettare l'esito della biopsia renale, comunque programmata, e se fosse risultata indicativa di ATS, procedere con l'analisi dei geni delle forme autosomiche.

INDICAZIONI FORNITE IN CONSULENZA GENETICA: il probando è stato informato che per orientarci chiaramente verso una ATS occorreva attendere l'esito della biopsia renale. In ogni caso, non era possibile un chiaro orientamento verso forme autosomiche o X-legate, comunque sulla base della consanguineità tra i genitori e il grave coinvolgimento oculare ed uditivo, avremo inizialmente effettuato l'indagine nel sospetto della forma autosomica recessiva di ATS.

RISPOSTA PRELIMINARE: riportata di seguito (pagine 96-97)

ESITO DELL'ANALISI MOLECOLARE: in seguito all'esito della biopsia renale, risultata compatibile con ATS, si è avviata l'analisi del gene *COL4A4*, che ha evidenziato una mutazione in omozigosi (vedi risposta riportata di seguito, pagine 98-99). L'insieme del quadro clinico e dell'esito dell'analisi molecolare ha confermato l'ipotesi di AR-ATS.

CONCLUSIONI: in questo caso l'indagine molecolare ha permesso di far diagnosi di AR-ATS. Questo non ha tante implicazioni per il probando stesso, ma quanto per il rischio di ricorrenza a livello familiare. Infatti i suoi figli ed i figli della sorella, a meno di consanguineità col partner, hanno un rischio di ricorrenza molto basso.



U.O. Genetica Medica Direttore Prof. Alessandra Renieri
Policlinico "Le Scotte" - viale Bracci - 53100 SIENA Tel. - 0577/585316-233303-233259
Fax 0577/233325 E-Mail: geneticamed@unisi.it - renieri@unisi.it

Siena, XX-XX-XXXX

Consulenza Genetica n. XXXX

XXXXX

XXXXX

XXXXX

e p.c. XXXX

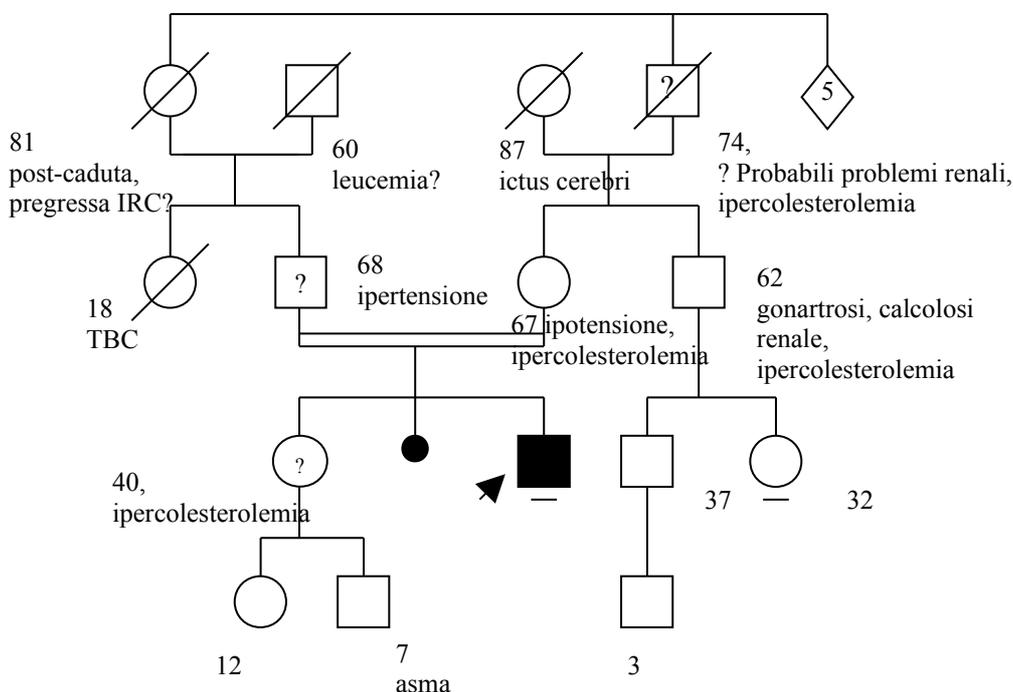
XXXX

XXXX

Motivo della consulenza: Il signor XXX ed il padre XXX giungono in consulenza il XX-XX-XXXX, per sindrome di Alport (ATS).

Quadro clinico e anamnesi familiare: XXX è nato il XX-XX-XXXX a termine da parto eutocico. Vengono riferiti frequenti episodi infettivi nell'infanzia, diagnosi di ipoacusia neurosensoriale bilaterale a 12 anni, trattata con protesi acustica, ed alcuni episodi di lipotimia tra i 20 e i 30 anni. Esami urine effettuati a partire dai 22 anni hanno riscontrato microematuria e proteinuria. Il signor XXX è stato sottoposto a biopsia renale a 28 anni che, a causa della scarsità del materiale prelevato, ha solamente escluso la presenza di depositi immunologici. Le indagini effettuate in tale occasione hanno evidenziato costante microematuria, proteinuria dosabile (circa 1 g/l; v.n. assente) che peggiorava dopo sforzo fisico e funzione renale nei limiti della norma (creatinemia 1,1 mg/dl, v.n. 0,7-1,30 mg/dl; clearance creatinina 107 ml/l, v.n. 95-145 ml/l). Il signor XXX riferisce ipercolesterolemia ed ipertrigliceridemia, ed esami del sangue a 33 anni evidenziano colesterolo di 269 mg/dl (v.n. 140-230 mg/dl) e trigliceridi di 194 mg/dl (v.n. 45-170 mg/dl). Recenti esami evidenziano proteinuria (4,80 g/24 ore), microematuria e creatininemia ai limiti superiori della norma (1,2 mg/dl). Il paziente riferisce, inoltre, che è in attesa di effettuare biopsia renale. Una visita oculistica effettuata a 28 anni ha evidenziato miopia, astigmatismo ed iniziale cheratocono e recentemente è stato riscontrato lenticono bilaterale.

I genitori sono primi cugini e un recente esame urine in entrambi è risultato nella norma. Il padre, XXX, presenta ipoacusia neurosensoriale bilaterale. Un recente esame urine della sorella evidenzia microematuria. L'albero genealogico mostra le seguenti caratteristiche:



Esami richiesti ed esito: è stato effettuato prelievo di sangue a XXX ed al padre, XXX, per estrazione del DNA.

Considerazioni:

La sindrome di Alport (ATS) è la più comune nefropatia ereditaria, caratterizzata da ematuria glomerulare di natura non immunologica con specifiche alterazioni delle membrane basali dei glomeruli renali, sordità di tipo percettivo e alterazioni oculari tipiche a carico della retina e del cristallino. Secondo le conoscenze attuali, la forma più comune di ATS (circa il 90% dei casi) si trasmette con modalità X-legata ed è causata da mutazioni nel gene *COL4A5*. In tale forma i maschi hanno la prognosi più severa, progredendo in insufficienza renale in giovane età. Le femmine invece presentano nella maggior parte dei casi microematuria isolata, evidenziabile all'esame urine. Solo una percentuale minima, circa il 12%, di femmine portatrici presenta un quadro clinico più grave con progressione verso l'insufficienza renale, sebbene in età più avanzata rispetto ai maschi.

Esistono inoltre altre due forme di *ATS*. Una forma, a trasmissione autosomica recessiva, è caratterizzata da una rapida progressione in insufficienza renale, sia nei maschi che nelle femmine. Un'altra forma, a trasmissione autosomica dominante, è caratterizzata da una lenta progressione in insufficienza renale, sia nei maschi che nelle femmine. Entrambe le forme autosomiche di *ATS* sono legate ai geni *COL4A3* e *COL4A4*.

La presenza nel signor XXX di nefropatia associata a ipoacusia e lenticone indirizza verso una *ATS*. Con le informazioni in nostro possesso è difficile discriminare se si tratta di *ATS* X-legata o autosomica. La presenza di consanguineità nei genitori sembra orientare verso una forma autosomica recessiva. Tuttavia, la compromissione nefrologica del paziente non è grave, come nei soggetti affetti da *ATS* autosomica recessiva. Non considerando la consanguineità tra i genitori possono essere considerate sia una forma X-legata che una forma autosomica dominante. Tuttavia, al fine di inquadrare meglio il caso e decidere quale esame genetico effettuare si richiedono: alcuni esami urine e del sangue con valutazione della creatinina e esame audiometrico dei genitori e della sorella di XXX. Rimaniamo, inoltre, in attesa del risultato della biopsia renale (analisi in microscopia elettronica e immunoistochimica) che il paziente effettuerà su consiglio dei colleghi nefrologhi.

Rimanendo a disposizione per eventuali chiarimenti

Cordiali Saluti

Il medico
Dott.ssa Vera Uliana

Il Direttore
Prof.ssa Alessandra Renieri



Siena, XX-XX-XXXX

Consulenza Genetica n. XXXX

XXXXX

e p.c. XXXX

XXXXX

XXXX

XXXXX

XXXX

A completamento della risposta inviata in data XX-XX-XXXX

Motivo della consulenza: Il signor XXX ed il padre XXX giungono in consulenza il XX-XX-XXXX, per sindrome di Alport (ATS).

Esami richiesti ed esito: in seguito alla consulenza sono stati richiesti alcuni esami del sangue e delle urine dei familiari ed il signor XXX è stato sottoposto ad agobiopsia renale.

Il signor XXX presenta microematuria e proteinuria, con creatininemia ai limiti superiori della norma (1,4 mg/dl; v.n. 0,8-1,5 mg/dl), grave ipoacusia neurosensoriale e cheratocono e lenticono bilaterali. L'agobiopsia renale, associata ad esame immunoistochimico, effettuata presso il Policlinico Umberto I° di Roma ha evidenziato reperti compatibili con patologia primitiva della Membrana Basale Glomerulare del tipo ATS. Recenti esami del sangue e delle urine effettuati dal padre, dalla madre e dalla sorella sono risultati nella norma. Si segnala, inoltre, ipoacusia bilaterale neurosensoriale di entità medio grave nel padre e lieve ipoacusia neurosensoriale sinistra nella madre.

È stata effettuata l'indagine molecolare del gene *COL4A4*, responsabile, insieme al gene *COL4A3*, delle forme autosomiche di ATS. Tale indagine ha evidenziato una mutazione in omozigosi nel signor XXX ed in eterozigosi nel padre (vedi allegato 1).

Considerazioni: L'esito dell'indagine molecolare effettuata conferma la diagnosi di ATS nel signor XXX. In particolare, il signor XXX, benchè all'età di 38 anni non presenti un'insufficienza renale conclamata, risulta affetto dalla forma autosomica recessiva di ATS. Ciò è dimostrato dal fatto che egli presenta la stessa mutazione sia sul cromosoma di origine paterna che sul cromosoma materno. La sorella, poiché non presenta segni clinici di ATS, potrebbe essere portatrice della mutazione, come il padre. La probabilità di ricorrenza della malattia nei figli del signor XXX e della sorella è bassa, a meno di consanguineità con l'eventuale partner.

Rimaniamo a disposizione per effettuare la ricerca della mutazione in tutti i familiari che lo richiedessero (per informazioni telefonare al numero 0577-585316).

Cordiali Saluti

Il medico
Dott.ssa Vera Uliana

Il Direttore
Prof.ssa Alessandra Renieri



Siena, XX-XX-XXXX

Allegato n.1

Esito delle indagini molecolari eseguite in questo laboratorio sul paziente

XXX campione n. 2907

Sul DNA di XXX è stato indagato il gene *COL4A4* responsabile, insieme al gene *COL4A3*, delle forme autosomiche di sindrome di Alport, mediante la tecnica della DHPLC. L'analisi ha evidenziato nell'esone 25 del gene *COL4A4* la mutazione c.1884-1886delC (p.P629fs652X) in omozigosi. La stessa mutazione, c.1884-1886delC (p.P629fs652X), è presente in eterozigoti nel padre, XXX.

Il paziente XXX risulta affetto dalla forma autosomica recessiva di sindrome di Alport.

A disposizione per qualsiasi chiarimento dei risultati

Cordiali Saluti

Il Biologo
Dott. Ilaria Longo

Nota: nonostante l'accuratezza delle tecniche utilizzate, le indagini di laboratorio, inclusi gli studi sul DNA, non costituiscono un presidio diagnostico definitivo in tutti i casi e non sono esenti da possibilità di errore (falsi negativi e falsi positivi). Tali errori possono essere dovuti a scambio di campione e errori nella definizione del genotipo. Questi ultimi possono derivare da tracce di contaminazione nelle reazioni di PCR, da contaminazione materna di campioni fetali e da rare varianti genetiche che possono interferire con l'analisi.

5. DISCUSSIONE

L'ATS è considerata una delle più frequenti nefropatie ereditarie, eventualmente associata ad ipoacusia ed anomalie visive, in cui sono stati descritte tre modalità di trasmissione, X-legata, autosomica recessiva ed autosomica dominante⁵.

L'ATS X-legata è la forma più frequente e quella conosciuta da più lungo tempo ed è causata da mutazioni nel gene *COL4A5*. La ricerca di mutazioni puntiformi in tale gene attualmente, presso la Genetica Medica dell'Università di Siena, viene effettuata tramite la tecnica del DHPLC. Nella nostra casistica tale tecnica presenta una sensibilità di solo il 50%. L'affidabilità nell'analisi molecolare dell'XL-ATS potrebbe essere migliorata sostituendo la tecnica del DHPLC con il sequenziamento automatico ed introducendo la ricerca di larghi riarrangiamenti del gene *COL4A5* tramite un kit commerciale MLPA (SALSA P191/P192 Alport kits). In futuro, per aumentare la sensibilità diagnostica, presso l'UOC Genetica Medica di Siena lo screening per ATS X-legata potrebbe essere impostato iniziando con la metodica dell'MLPA per la ricerca di delezioni esoniche. I casi negativi saranno successivamente analizzati mediante il sequenziamento automatico per la ricerca di mutazioni puntiformi.

Le forme autosomiche di ATS sono causate da mutazioni nei geni *COL4A3* e *COL4A4*. Presso la Genetica Medica dell'Università di Siena, viene effettuata la ricerca di mutazioni puntiformi in tali geni tramite la tecnica del DHPLC. Anche in questo caso, l'analisi molecolare completa di ciascun gene richiede non meno di 12 mesi. A nostra conoscenza, non è attualmente noto se larghi riarrangiamenti in questi geni possano essere associati a forme autosomiche di ATS. Sarebbe, comunque, auspicabile mettere a punto una tecnica per ricercare tali riarrangiamenti, in modo da verificarlo. In tale ipotesi, l'utilizzo di una metodica in grado di individuare larghi riarrangiamenti intra-genici potrebbe aumentare la sensibilità dello screening delle forme autosomiche di ATS.

La descrizione delle varie forme di ATS, ha fatto emergere la grande variabilità fenotipica che caratterizza tale patologia. Ci si è dunque chiesti se potessi esserci una correlazione genotipo-fenotipo. Nell'XL-ATS, tali correlazioni sono state cercate nell'ambito dello studio portato avanti dalla Concerted Action europea (Jais, et al 2000; Jais et al, 2003). Nei maschi affetti da ATS X-legata è stato evidenziato un coinvolgimento renale più grave nel caso di larghi riarrangiamenti intra-genici o di mutazioni nonsense che portano ad uno stop prematuro, rispetto agli altri tipi di mutazioni⁴³. Nelle femmine portatrici di ATS X-legata, non sono state evidenziate correlazioni statisticamente significative tra tipo di mutazione e

fenotipo. È stata, comunque, rilevata una progressione apparentemente più favorevole delle donne con mutazioni missenso⁶⁶. A nostra conoscenza, in letteratura non ci sono dati statistici di correlazione genotipo-fenotipo che riguardano le forme autosomiche. Le mutazioni in eterozigosi dei geni *COL4A3* e *COL4A4* sono associate ad un ampio spettro fenotipico per quanto riguarda il coinvolgimento renale, che va dall'asintomaticità, come si può avere in genitori eterozigoti di pazienti con AR-ATS, alla microematuria familiare benigna, all'AD-ATS. Quello che invece in genere è assente in queste forme è una compromissione oculare o una severa ipoacusia. In tutti questi fenotipi sono state descritte mutazioni di tutti i tipi e localizzate lungo tutti i geni. Questi dati, anche se manca uno studio sistematico, non sembrano indicare una chiara correlazione genotipo-fenotipo. Si potrebbe, quindi, ipotizzare che l'espressione clinica di una mutazione patogenetica possa essere influenzata da polimorfismi negli stessi geni *COL4A3* e *COL4A4*, o da polimorfismi in geni che codificano per proteine che hanno ruolo nella filtrazione glomerulare^{15, 86}. Le mutazioni in omozigosi o in eterozigosi composta in uno dei due geni, *COL4A3* e *COL4A4*, sono invece associate alla AR-ATS, classicamente descritta come una forma severa, caratterizzata da insufficienza renale in età precoce, ipoacusia e segni oculari⁸⁷. Va segnalato, comunque, che sono stati descritti pazienti con mutazioni in entrambi gli alleli di uno dei due geni responsabili delle forme autosomiche di ATS e fenotipo più lieve, simile a quello delle forme autosomiche dominanti⁵. Sembra chiaro, quindi, che non c'è un confine netto tra le diagnosi di ATS-AR, BFH, ATS-AD, ma che esse rappresentano un continuum fenotipico con diversi livelli di gravità. In questa ottica sarebbe più corretto parlare di "malattie del collagene IV". Da un punto di vista clinico è tuttavia importante mantenere l'etichetta di ATS-AR, ATS-AD, BFH perché questa ha un valore prognostico. Per certi aspetti l'analisi molecolare di questi geni del collagene può aiutare la diagnosi ma ha un valore limitato per emettere una prognosi, che richiede una corretta valutazione clinica effettuata in consulenza genetica.

Il processo della consulenza genetica richiede, come abbiamo visto, un'accurata raccolta dell'albero familiare e della storia clinica del paziente. Gli elementi cui porre attenzione non sono molti, ma vanno raccolti con cura. Nella storia del probando vanno considerati la presenza di anomalie all'esame urine ed età comparsa, episodi di macroematuria, la funzionalità renale, l'eventuale esito della biopsia renale, in particolare studio ultrastrutturale ed analisi immunoistochimica per le catene del collagene di tipo IV, e cosa hanno evidenziato esame audiometrico ed oftalmologico. Sintomi quali disfagia ed epigastralgia vanno valutati nell'ipotesi della rara associazione tra ATS e leiomiomatosi diffusa. Vengono richiesti questi dati anche nei familiari, in particolare si indaga se sono

presenti anomalie degli esami urine, insufficienza renale o ipoacusia. Idealmente un corretto inquadramento diagnostico del paziente con ATS deriva dalla collaborazione tra varie figure professionali, come è accaduto nel caso 1 in cui lo specialista nefrologo ha sospettato una ATS, confermata poi dal punto di vista anatomo-patologico, e l'accurata ricostruzione dell'albero genealogico ha permesso di orientare più precisamente la diagnosi verso una forma autosomica dominante di ATS. In questo contesto, il genetista considera tutti gli specifici elementi e valuta se considerare il quadro suggestivo di ATS. In alcuni casi, non è chiara la modalità di trasmissione all'interno della famiglia, per cui il genetista può considerare opportuno consigliare ulteriori indagini, che possono essere esami urine, ematochimici o strumentali, quali audiometria o biopsia cutanea con immunistochimica per catene del collagene di tipo IV. Naturalmente, la decisione su quali indagini effettuare viene presa in accordo con lo specialista di riferimento. Sulla base dei dati raccolti ed eventualmente sull'esito degli ulteriori esami richiesti, il genetista a questo punto può decidere che indagine molecolare è opportuno avviare. Infatti i geni responsabili della ATS sono tre, tutti molto grandi e occorre un lungo e costoso lavoro per analizzarli. La consulenza genetica, come abbiamo detto, non è solo orientata a valutare quale sia l'indagine molecolare più indicata, ma è anche fondamentale per un corretto orientamento diagnostico e prognostico, a prescindere dall'esito dell'analisi stessa. In tal senso, in consulenza genetica viene fornita un'indicazione sull'impatto che la malattia può avere sul paziente e sulla famiglia e un'indicazione relativa al rischio di ricorrenza. Nel caso 2, in seguito alla consulenza genetica e alla successiva interazione tra genetista, nefrologo di riferimento e paziente, si è giunti ad un corretto inquadramento diagnostico e che ha permesso di formulare un chiaro rischio di ricorrenza, anche se l'analisi molecolare è risultata non informativa. In questo caso, l'insieme del quadro clinico, della storia familiare ed il risultato della biopsia cutanea, hanno permesso di rispondere al quesito specifico posto dal probando che riguardava il rischio di ricorrenza. Al probando è stata diagnosticata una forma X-legata di ATS, quindi, in base alle leggi della genetica formale, il rischio di ricorrenza per i figli maschi era assente mentre tutte le figlie avrebbero ereditato la mutazione e sarebbero, quindi, risultate portatrici.

La consulenza genetica per ATS, inoltre, come tutte le consulenze per malattie genetiche deve comprendere una discussione aperta sulla storia naturale, sulle possibilità di terapia, sulla prognosi così come una valutazione delle implicazioni psicosociali. Va considerato che il peso di una malattia può cambiare con la gravità della malattia stessa, ma sarà sempre diverso da individuo ad individuo e da famiglia a famiglia. Nella nostra esperienza personale, in consulenza vengono richiesti, oltre al rischio di ricorrenza,

informazioni su storia naturale e aspetti terapeutici. Per quanto riguarda quest'ultimo punto, attualmente non vi è a disposizione una terapia specifica per l'ATS, che viene trattata essenzialmente con il trapianto renale⁴². Nei pazienti con chiara diagnosi di ATS, in cui è presente proteinuria e funzionalità renale normale, anche in assenza di linee guida precise, la maggior parte dei clinici utilizza farmaci “nefroprotettivi” allo scopo di rallentare la progressione della patologia⁵². In tal senso, sarebbe probabilmente utile effettuare studi clinici specifici per poter valutare quale terapia presenta i migliori benefici per il paziente. In generale, andrebbe valutato più accuratamente quale tipo di terapia farmacologia attuare, quando iniziarla (ad esempio se utilizzare qualche farmaco quando l'unico segno è la microematuria o aspettare la comparsa della proteinuria, come si fa attualmente) e quali presidi dietetici ed igienici sono i più indicati in questi pazienti. Nella nostra esperienza, le famiglie richiedono informazioni poi si dimostrano disponibili a partecipare a tali studi, nel caso venissero avviati. Per quanto riguarda la terapia genica o la terapia con cellule staminali, dati i risultati solo preliminari ottenuti nei modelli animali e la potenziale pericolosità di tali interventi, ancora molto lavoro è necessario per poter pensare ad applicazioni umane. Tale approccio comunque, a nostro parere, presenta grosse potenzialità per il trattamento della ATS.

L'ATS è, quindi, una patologia in cui la diagnosi è clinica e non ci sono terapie specifiche. Ci si può chiedere quale sia nell'immediato il reale beneficio nell'effettuare l'analisi molecolare, prescindendo dalle possibili prospettive terapeutiche future. Le motivazioni sono riconducibili al fatto che a volte l'analisi molecolare è discriminante per fare diagnosi e al fatto che l'analisi molecolare può essere di fondamentale importanza per una corretta definizione del rischio di ricorrenza a livello familiare. Non sempre è possibile una diagnosi clinica di certezza di ATS, ricordiamo a questo proposito che il lavoro condotto sulla XL-ATS dalla Concerted Action europea ha evidenziato che nel 38% dei casi di ATS X-legata con conferma molecolare studiato non erano presenti almeno 3 dei 4 criteri per la diagnosi clinica di ATS^{43, 66}. Quindi, su base solo clinica, soprattutto quando non è possibile ottenere la biopsia renale, la diagnosi può non essere così certa. Inoltre, anche nei casi in cui dal punto di vista clinico ci si orienta verso una ATS, può non essere possibile discriminare solo su base clinica tra forma autosomica e forma X-legata. Ad esempio nel caso 3, le uniche affette della famiglia erano femmine, senza casi di insufficienza renale in età precoce. Non era, quindi, possibile discriminare su base clinica tra una forma X-legata ed una forma autosomica dominante. La richiesta della probanda, in questo caso, era una definizione del rischio di ricorrenza. e, se in entrambi i casi gli eventuali figli avrebbero avuto un rischio del 50% di

ereditare la mutazione, le due ipotesi avevano chiaramente implicazioni familiari molto diverse. In questo caso, l'analisi molecolare ha purtroppo ha confermato che la probanda era portatrice di una forma X-legata di ATS. I suoi eventuali figli maschi avrebbero quindi avuto un rischio del 50% di essere affetti da una nefropatia grave, che non si era mai manifestata nella famiglia. Inoltre, il fatto di aver identificato la mutazione in una donna, ha consentito di discutere la possibilità di una diagnosi prenatale in future gravidanze. In tale caso, la ricerca della mutazione riscontrata nella probanda viene effettuata solo nel caso il feto risulti di sesso maschile. Nel caso 5, l'analisi molecolare ha consentito non solo la conferma diagnostica ma è stata discriminante per la definizione del rischio di ricorrenza. Il probando, in cui il riscontro di una mutazione in eterozigosi del gene *COL4A4* ha confermato l'ipotesi di AD-ATS, presentava due figlie con anomalie all'esame urine. Una figlia presentava proteinuria intermittente ed in lei era stata fatta diagnosi di tetralogia di Fallot alla nascita, mentre l'altra presentava microematuria e proteinuria, senza anomalie cardiache. Non era, comunque, possibile escludere o confermare sulla sola base clinica se solo una od entrambe avessero ereditato la nefropatia paterna. Il riscontro della mutazione nel padre ha potuto chiarire la situazione, infatti la figlia con tetralogia di Fallot non aveva ereditato la mutazione, quindi non era a rischio di nefropatia tipo ATS, mentre l'altra aveva ereditato la mutazione. Questo è un esempio di come l'analisi molecolare abbia permesso di fare diagnosi in una situazione familiare complicata da altre patologie. Anche nel caso 6, il riscontro della mutazione ha permesso di una più chiara definizione del rischio di ricorrenza a livello familiare. In questo caso, la consanguineità tra i genitori ed il severo coinvolgimento uditivo ed oculare nel probando, orientavano verso una forma recessiva di ATS, ma poiché l'affetto era maschio non era del tutto possibile escludere una forma X-legata. Discriminare tra le due forme era utile a livello familiare, in particolare per poter definire il rischio di ricorrenza della sorella. L'analisi molecolare sul probando ha evidenziato una mutazione in omozigosi nel gene *COL4A4*. Il rischio di ricorrenza negli eventuali figli del probando e della sorella è quindi basso, a meno di consanguineità col partner. Una particolarità da segnalare in questa famiglia è la lieve compromissione renale nel probando, in cui a 36 anni la funzionalità renale era conservata, a sottolineare l'eterogeneità clinica dell'AR-ATS.

Una corretta consulenza genetica consente, quindi, un orientamento diagnostico relativo all'ipotesi di ATS, valutando da un lato analisi di laboratorio, strumentali ed elementi clinici, dall'altro eterogeneità genetica ed espressività variabile. Inoltre, un'accurata valutazione diagnostica e la consulenza genetica costituiscono una parte importante dell'assistenza del paziente e possono permettere agli altri individui della famiglia di assumere

delle decisioni responsabili sui loro rischi riproduttivi. Questo processo di inquadramento prognostico e di valutazione della prognosi e del rischio di ricorrenza, si giova poi dell'analisi molecolare. Infatti, l'insieme del processo clinico-diagnostico e dell'esito dell'analisi molecolare, possono consentire di trarre conclusioni sul probando e di dare informazioni ai familiari. In conclusione, la diagnosi definitiva sul paziente a cui è correlato l'aspetto prognostico deriva da una valutazione ponderata dell'analisi molecolare insieme ai dati derivanti da un dettagliato albero genealogico e ai dati derivanti da un attento follow-up del paziente e dei familiari. La diagnosi sul paziente consente, poi, corrette valutazioni sulla ricorrenza a livello familiare.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Caselli R, Mencarelli MA, Papa FT, Uliana V, Schiavone S, Strambi M, Pescucci C, Ariani F, Rossi V, Longo I, Meloni I, Renieri A, Mari F. A 2.6 Mb deletion of 6q24.3-25.1 in a patient with growth failure, cardiac septal defect, thin upperlip and asymmetric dysmorphic ears. *Eur J Med Genet* 2007;**50**:315-21.
2. Uliana V, Giordano N, Caselli R, Papa FT, Ariani F, Marcocci C, Gianetti E, Martini G, Papakostas P, Rollo F, Meloni I, Mari F, Priolo M, Renieri A, Nuti R. Expanding the phenotype of 22q11 deletion syndrome: the MURCS association. *Clin Dysmorphol* 2008;**17**:13-7.
3. Ariani F, Hayek G, Rondinella D, Artuso R, Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, Pollazzon M, Buoni S, Spiga O, Ricciardi S, Meloni I, Longo I, Mari F, Broccoli V, Zappella M, Renieri A. FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet* 2008;**83**:89-93.
4. Caselli R, Speciale C, Pescucci C, Uliana V, Sampieri K, Bruttini M, Longo I, De Francesco S, Pramparo T, Zuffardi O, Frezzotti R, Acquaviva A, Hadjistilianou T, Renieri A, Mari F. Retinoblastoma and mental retardation microdeletion syndrome: clinical characterization and molecular dissection using array CGH. *J Hum Genet* 2007;**52**:535-42.
5. Pescucci C, Longo I, Mari F, Scala E, Bruttini M, Caselli R, Renieri A. [Clinical and genetic features of the Alport 'syndromes']. *G Ital Nefrol* 2005;**22**:466-76.
6. Flinter FA, Cameron JS, Chantler C, Houston I, Bobrow M. Genetics of classic Alport's syndrome. *Lancet* 1988;**2**:1005-7.
7. Wing AJ, Brunner FP. Twenty-three years of dialysis and transplantation in Europe: experiences of the EDTA Registry. *Am J Kidney Dis* 1989;**14**:341-6.
8. Atkin CL, Hasstedt SJ, Menlove L, Cannon L, Kirschner N, Schwartz C, Nguyen K, Skolnick M. Mapping of Alport syndrome to the long arm of the X chromosome. *Am J Hum Genet* 1988;**42**:249-55.
9. Boutaud A, Borza DB, Bondar O, Gunwar S, Netzer KO, Singh N, Ninomiya Y, Sado Y, Noelken ME, Hudson BG. Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *J Biol Chem* 2000;**275**:30716-24.
10. Heiskari N, Zhang X, Zhou J, Leinonen A, Barker D, Gregory M, Atkin CL, Netzer KO, Weber M, Reeders S, Gronhagen-Riska C, Neumann HP, Trembath R, Tryggvason K.

- Identification of 17 mutations in ten exons in the COL4A5 collagen gene, but no mutations found in four exons in COL4A6: a study of 250 patients with hematuria and suspected of having Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1996;**7**:702-9.
11. Tryggvason K. Mutations in type IV collagen genes and Alport phenotypes. *Contrib Nephrol* 1996;**117**:154-71.
 12. Lemmink HH, Schroder CH, Monnens LA, Smeets HJ. The clinical spectrum of type IV collagen mutations. *Hum Mutat* 1997;**9**:477-99.
 13. Renieri A, Bruttini M, Galli L, Zanelli P, Neri T, Rossetti S, Turco A, Heiskari N, Zhou J, Gusmano R, Massella L, Banfi G, Scolari F, Sessa A, Rizzoni G, Tryggvason K, Pignatti PF, Savi M, Ballabio A, De Marchi M. X-linked Alport syndrome: an SSCP-based mutation survey over all 51 exons of the COL4A5 gene. *Am J Hum Genet* 1996;**58**:1192-204.
 14. Longo I, Porcedda P, Mari F, Giachino D, Meloni I, Deplano C, Brusco A, Bosio M, Massella L, Lavoratti G, Roccatello D, Frasca G, Mazzucco G, Muda AO, Conti M, Fasciolo F, Arrondel C, Heidet L, Renieri A, De Marchi M. COL4A3/COL4A4 mutations: from familial hematuria to autosomal-dominant or recessive Alport syndrome. *Kidney Int* 2002;**61**:1947-56.
 15. Marcocci E, Uliana V, Bruttini M, Artuso R, Silengo MC, Zerial M, Bergesio F, Amoroso A, Savoldi S, Pennesi M, Giachino D, Rombola G, Fogazzi GB, Rosatelli C, Martinhago CD, Carmellini M, Mancini R, Di Costanzo G, Longo I, Renieri A, Mari F. Autosomal dominant Alport syndrome: molecular analysis of the COL4A4 gene and clinical outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2009;**24**:1464-71.
 16. Frasca GM, Onetti-Muda A, Renieri A. Thin glomerular basement membrane disease. *J Nephrol* 2000;**13**:15-9.
 17. Thielen BK, Barker DF, Nelson RD, Zhou J, Kren SM, Segal Y. Deletion mapping in Alport syndrome and Alport syndrome-diffuse leiomyomatosis reveals potential mechanisms of visceral smooth muscle overgrowth. *Hum Mutat* 2003;**22**:419.
 18. Heidet L, Cai Y, Sado Y, Ninomiya Y, Thorner P, Guicharnaud L, Boye E, Chauvet V, Solal LC, Beziau A, Torres RG, Antignac C, Gubler MC. Diffuse leiomyomatosis associated with X-linked Alport syndrome: extracellular matrix study using immunohistochemistry and in situ hybridization. *Lab Invest* 1997;**76**:233-43.
 19. Segal Y, Peissel B, Renieri A, de Marchi M, Ballabio A, Pei Y, Zhou J. LINE-1 elements at the sites of molecular rearrangements in Alport syndrome-diffuse leiomyomatosis. *Am J Hum Genet* 1999;**64**:62-9.

20. Meloni I, Vitelli F, Pucci L, Lowry RB, Tonlorenzi R, Rossi E, Ventura M, Rizzoni G, Kashtan CE, Pober B, Renieri A. Alport syndrome and mental retardation: clinical and genetic dissection of the contiguous gene deletion syndrome in Xq22.3 (ATS-MR). *J Med Genet* 2002;**39**:359-65.
21. Alport. Hereditary familial congenital hemorrhagic nephritis. *Brit. Med. J* 1927;**1**:504-506.
22. Shaw RF KR. Population genetics of Alport's syndrome: hypothesis of abnormal segregation and the necessary existence of mutation. *Nephron* 1976;**16**:427.
23. Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC, Gregory MC, Skolnick MH, Atkin CL, Tryggvason K. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 1990;**248**:1224-7.
24. Smeets HJ LH, Van Den Heuvel LPea. Molecular and immunological studies in X-linked and autosomal recessive in Alport syndrome. *Am. J. Hum. Genet* 1993;**53**:1230.
25. Lemmink HH, Mochizuki T, van den Heuvel LP, Schroder CH, Barrientos A, Monnens LA, van Oost BA, Brunner HG, Reeders ST, Smeets HJ. Mutations in the type IV collagen alpha 3 (COL4A3) gene in autosomal recessive Alport syndrome. *Hum Mol Genet* 1994;**3**:1269-73.
26. Mochizuki T, Lemmink HH, Mariyama M, Antignac C, Gubler MC, Pirson Y, Verellen-Dumoulin C, Chan B, Schroder CH, Smeets HJ, et al. Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet* 1994;**8**:77-81.
27. Lemmink HH, Nillesen WN, Mochizuki T, Schroder CH, Brunner HG, van Oost BA, Monnens LA, Smeets HJ. Benign familial hematuria due to mutation of the type IV collagen alpha4 gene. *J Clin Invest* 1996;**98**:1114-8.
28. Boye E, Mollet G, Forestier L, Cohen-Solal L, Heidet L, Cochat P, Grunfeld JP, Palcoux JB, Gubler MC, Antignac C. Determination of the genomic structure of the COL4A4 gene and of novel mutations causing autosomal recessive Alport syndrome. *Am J Hum Genet* 1998;**63**:1329-40.
29. Buzza M, Wang YY, Dagher H, Babon JJ, Cotton RG, Powell H, Dowling J, Savige J. COL4A4 mutation in thin basement membrane disease previously described in Alport syndrome. *Kidney Int* 2001;**60**:480-3.
30. Feingold J, Bois E, Chompret A, Broyer M, Gubler MC, Grunfeld JP. Genetic heterogeneity of Alport syndrome. *Kidney Int* 1985;**27**:672-7.

31. van der Loop FT, Heidet L, Timmer ED, van den Bosch BJ, Leinonen A, Antignac C, Jefferson JA, Maxwell AP, Monnens LA, Schroder CH, Smeets HJ. Autosomal dominant Alport syndrome caused by a COL4A3 splice site mutation. *Kidney Int* 2000;**58**:1870-5.
32. Ciccarese M, Casu D, Ki Wong F, Faedda R, Arvidsson S, Tonolo G, Luthman H, Satta A. Identification of a new mutation in the alpha4(IV) collagen gene in a family with autosomal dominant Alport syndrome and hypercholesterolaemia. *Nephrol Dial Transplant* 2001;**16**:2008-12.
33. Thorner PS. Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *Nephron Clin Pract* 2007;**106**:c82-8.
34. Leinonen A, Mariyama M, Mochizuki T, Tryggvason K, Reeders ST. Complete primary structure of the human type IV collagen alpha 4(IV) chain. Comparison with structure and expression of the other alpha (IV) chains. *J Biol Chem* 1994;**269**:26172-7.
35. Griffin CA, Emanuel BS, Hansen JR, Cavenee WK, Myers JC. Human collagen genes encoding basement membrane alpha 1 (IV) and alpha 2 (IV) chains map to the distal long arm of chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;**84**:512-6.
36. Mariyama M, Zheng K, Yang-Feng TL, Reeders ST. Colocalization of the genes for the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) chains of type IV collagen to chromosome 2 bands q35-q37. *Genomics* 1992;**13**:809-13.
37. Zhou J, Mochizuki T, Smeets H, Antignac C, Laurila P, de Paepe A, Tryggvason K, Reeders ST. Deletion of the paired alpha 5(IV) and alpha 6(IV) collagen genes in inherited smooth muscle tumors. *Science* 1993;**261**:1167-9.
38. Pihlajaniemi T, Pohjalainen ER, Myers J. Complete primary structure of the triple-helical region and the carboxy-terminal domain of a new type IV collagen chain a5(IV). *J. Biol. Chem.* 1990;**265**:13758-13766.
39. Burbelo PD, Martin GR, Yamada Y. a1(IV) and a2(IV) collagen genes are regulated by a bidirectional promoter and a shared enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988;**85**:9679-9682.
40. Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kuhn K. A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem* 1981;**120**:203-11.
41. Hudson BG. The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family. *J Am Soc Nephrol* 2004;**15**:2514-27.
42. Kashtan CE. Renal transplantation in patients with Alport syndrome. *Pediatr Transplant* 2006;**10**:651-7.

43. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F, Pirson Y, Verellen C, Wieslander J, Persson U, Tryggvason K, Martin P, Hertz JM, Schroder C, Sanak M, Krejcova S, Carvalho MF, Saus J, Antignac C, Smeets H, Gubler MC. X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype- phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol* 2000;**11**:649-57.
44. Sabates R, Kaachmer JH, Weihngest TA. Ocular findings in Alport's syndrome. *Ophthalmologica* 1983;**186**:204-210.
45. Colville DJ, Savige J. Alport syndrome. A review of the ocular manifestations. *Ophthalmic Genet* 1997;**18**:161-73.
46. Fawzi AA, Lee NG, Elliott D, Song J, Stewart JM. Retinal findings in patients with Alport Syndrome: expanding the clinical spectrum. *Br J Ophthalmol* 2009;**93**:1606-11.
47. Gubler MC. Inherited diseases of the glomerular basement membrane. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008;**4**:24-37.
48. Haas M. Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy: a practical approach to diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2009;**133**:224-32.
49. Rana K, Wang YY, Buzza M, Tonna S, Zhang KW, Lin T, Sin L, Padavarat S, Savige J. The genetics of thin basement membrane nephropathy. *Semin Nephrol* 2005;**25**:163-70.
50. Ding J, Yang J, Liu J, Yu L. Immunofluorescence study of type IV collagen alpha chains in epidermal basement membrane: application in diagnosis of X-linked Alport syndrome. *Chin Med J (Engl)* 1997;**110**:584-6.
51. Muda AO, Massella L, Giannakakis K, Renieri A, Rizzoni G, Faraggiana T. Confocal microscopy of the skin in the diagnosis of X-linked Alport syndrome. *J Invest Dermatol* 2003;**121**:208-11.
52. Gross O, Kashtan CE. Treatment of Alport syndrome: beyond animal models. *Kidney Int* 2009;**76**:599-603.
53. Gross O, Schulze-Lohoff E, Koepke ML, Beirowski B, Addicks K, Bloch W, Smyth N, Weber M. Antifibrotic, nephroprotective potential of ACE inhibitor vs AT1 antagonist in a murine model of renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2004;**19**:1716-23.
54. Grodecki KM, Gains MJ, Baumal R, Osmond DH, Cotter B, Valli VE, Jacobs RM. Treatment of X-linked hereditary nephritis in Samoyed dogs with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor. *J Comp Pathol* 1997;**117**:209-25.
55. Heikkila P, Tryggvason K, Thorner P. Animal models of Alport syndrome: advancing the prospects for effective human gene therapy. *Exp Nephrol* 2000;**8**:1-7.

56. Heidet L, Borza DB, Jouin M, Sich M, Mattei MG, Sado Y, Hudson BG, Hastie N, Antignac C, Gubler MC. A human-mouse chimera of the alpha3alpha4alpha5(IV) collagen protomer rescues the renal phenotype in Col4a3^{-/-} Alport mice. *Am J Pathol* 2003;**163**:1633-44.
57. Prodromidi EI, Poulsom R, Jeffery R, Roufosse CA, Pollard PJ, Pusey CD, Cook HT. Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Stem Cells* 2006;**24**:2448-55.
58. Sugimoto H, Mundel TM, Sund M, Xie L, Cosgrove D, Kalluri R. Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:7321-6.
59. LeBleu V, Sugimoto H, Mundel TM, Gerami-Naini B, Finan E, Miller CA, Gattone VH, 2nd, Lu L, Shield CF, 3rd, Folkman J, Kalluri R. Stem cell therapies benefit Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2009;**20**:2359-70.
60. Ninichuk V, Gross O, Segerer S, Hoffmann R, Radomska E, Buchstaller A, Huss R, Akis N, Schlondorff D, Anders HJ. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney Int* 2006;**70**:121-9.
61. Katayama K, Kawano M, Naito I, Ishikawa H, Sado Y, Asakawa N, Murata T, Oosugi K, Kiyohara M, Ishikawa E, Ito M, Nomura S. Irradiation prolongs survival of Alport mice. *J Am Soc Nephrol* 2008;**19**:1692-700.
62. Ko JY, Lee HS, Park CH, Koh HC, Lee YS, Lee SH. Conditions for tumor-free and dopamine neuron-enriched grafts after transplanting human ES cell-derived neural precursor cells. *Mol Ther* 2009;**17**:1761-70.
63. Zhou J, Leinonen A, Tryggvason K. Structure of the human type IV collagen COL4A5 gene. *J Biol Chem*. 1994;**269**:6608-6614.
64. Nomura S, Osawa G, Sai T, Harano T, Harano K. A splicing mutation in the alpha5(IV) collagen gene of a family with Alport syndrome. *Kidney Int*. 1993;**43**:1116-1124.
65. Lemmink HH, Kluijtmans AJ, Brunner HG, Schroeder CH, Knebelmann B, Jelinkova E, van Oost BA, Monnens LAH, Smeets JM. Aberrant splicing of the COL4A5 gene in patient with Alport syndrome. *Human Molecular Genetics* 1994;**3**:317-322.
66. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F, Pirson Y, Verellen C, Wieslander J, Persson U, Tryggvason K, Martin P, Hertz JM, Schroeder C, Sanak M, Krejcova S, Carvalho MF, Saus J, Antignac C, Smeets H, Gubler MC. X-linked Alport syndrome: natural history and genotype-

- phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families: a "European Community Alport Syndrome Concerted Action" study. *Journal of American Society of Nephrology* 2003;**14**:2603-2610.
67. Renieri A, Galli L, Grillo A, Bruttini M, Neri T, Zanelli P, Rizzoni G, Massella L, Sessa A, Meroni M, et al. Major COL4A5 gene rearrangements in patients with juvenile type Alport syndrome. *Am J Med Genet* 1995;**59**:380-5.
 68. Pescucci C, Mari F, Longo I, Vogiatzi P, Caselli R, Scala E, Abaterusso C, Gusmano R, Seri M, Miglietti N, Bresin E, Renieri A. Autosomal-dominant Alport syndrome: natural history of a disease due to COL4A3 or COL4A4 gene. *Kidney Int.* 2004;**65**:1598-603.
 69. Kleppel MM, Santi PA, Cameron JD, Wieslander J, Michael AF. Human tissue distribution of novel basement membrane collagen. *Am J Pathol* 1989;**134**:813-25.
 70. Mochizuki T, Lemmink HH, Maryiama M, Antignac C, Gubler MC, Pirson Y, Verellen C, Chan B, Schroder CH, Smeets HJ, Reeders ST. Identification of mutations in the a3(IV) and a4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nature Genetics* 1994;**8**:77-82.
 71. Jefferson JA, Lemmink HH, Hughes AE, Hill CM, Smeets HJM, Doherty CC, Maxwell AP. Autosomal dominant Alport Syndrome linked to the type IV collagen a3 and a4 genes (COL4A3 and COL4A4). *Nephrol Dial Transplant* 1997;**12**:1595-1599.
 72. Turco AE, Rossetti S, Rizzoni G, Massella L, Saarinen NH, Renieri A, Pignatti PF, De Marchi M. A novel missense mutation in exon 3 of the COL4A5 gene associated with late-onset Alport syndrome. *Clinical genetics* 1995;**48**:261-263.
 73. Piccini M, Casari G, Zhou J, Bruttini M, Volti SL, Ballabio A, Renieri A. Evidence for genetic heterogeneity in benign familial hematuria. *Am J Nephrol* 1999;**19**:464-7.
 74. Wang Y, Rana K, Tonna S, Lin T, Sin L, Savige J. COL4A3 mutations and their clinical consequences in thin basement membrane nephropathy (TBMN). *Kidney Int.* 2004;**65**:786-90.
 75. Garcia-Torres R, Cruz D, Orozco L, Heidet L, Gubler MC. Alport syndrome and diffuse leiomyomatosis. Clinical aspects, pathology, molecular biology and extracellular matrix studies. A synthesis. *Nephrologie* 2000;**21**:9-12.
 76. Garcia-Torres R, Orozco L. Alport-leiomyomatosis syndrome: an update. *Am J Kidney Dis* 1993;**22**:641-8.
 77. Guillem P, Delcambre F, Cohen-Solal L, Triboulet JP, Antignac C, Heidet L, Quandalle P. Diffuse esophageal leiomyomatosis with perirectal involvement mimicking Hirschsprung disease. *Gastroenterology* 2001;**120**:216-20.

78. Garcia Torres R, Guarner V. [Leiomyomatosis of the esophagus, tracheo-bronchi and genitals associated with Alport type hereditary nephropathy: a new syndrome]. *Rev Gastroenterol Mex* 1983;**48**:163-70.
79. Sugimoto M, Oohashi T, Ninomiya Y. The genes COL4A5 and COL4A6, coding for basement membrane collagen chain $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$, are located head-to-head in close proximity on human chromosome Xq22 and COL4A6 is transcribed from two alternative promoters. *Proc Natl Acad Sci* 1994;**91**:11679-11683.
80. Heidet L, Dahan K, Zhou J, Xu Z, Cochat P, Gould JDM, Leppig KA, Proesmans W, Guyot C, Roussel B, Tryggvason K, Grunfeld J-P, Gubler MC, Antignac C. Deletions of both $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ collagen genes in Alport syndrome and in Alport syndrome associated with smooth muscle tumours. *Human Molecular Genetics* 1995;**4**:99-108.
81. Segal Y, Zhuang L, Rondeau E, Sraer JD, Zhou J. Regulation of the paired type IV collagen genes COL4A5 and COL4A6. Role of the proximal promoter region. *J Biol Chem* 2001;**276**:11791-7.
82. Kriseman J, Busick C, Szeling S, Dinu V. Bing: Biomedical informatics pipeline for next generation sequencing. *J Biomed Inform* 2009.
83. Spiegelman JJ, Mindrinos MN, Oefner PJ. High-accuracy DNA sequence variation screening by DHPLC. *Biotechniques* 2000;**29**:1084-90, 1092.
84. Schouten JA, Ladame S, Mason SJ, Cooper MA, Balasubramanian S. G-quadruplex-specific peptide-hemicyanine ligands by partial combinatorial selection. *J Am Chem Soc* 2003;**125**:5594-5.
85. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;**258**:818-21.
86. Voskarides K, Damianou L, Neocleous V, Zouvani I, Christodoulidou S, Hadjiconstantinou V, Ioannou K, Athanasiou Y, Patsias C, Alexopoulos E, Pierides A, Kyriacou K, Deltas C. COL4A3/COL4A4 mutations producing focal segmental glomerulosclerosis and renal failure in thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007;**18**:3004-16.
87. Longo I, Scala E, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Mencarelli MA, Speciale C, Giani M, Bresin E, Caringella DA, Borochowitz ZU, Siriwardena K, Winship I, Renieri A, Meloni I. Autosomal recessive Alport syndrome: an in-depth clinical and molecular analysis of five families. *Nephrol Dial Transplant* 2006;**21**:665-71.

“Non al denaro non all’amore né al cielo”

Fabrizio De Andrè

Di questi quattro anni ricordo scelte e cambiamenti, oltre che formazione.

Ringrazio chi ha permesso la realizzazione di questa tappa, la professoressa Alessandra Renieri e la dottoressa Francesca Mari, la dottoressa Mirella Bruttini, che mi è stata vicina non solo dal punto di vista lavorativo.

Ringrazio la dottoressa Manuela Priolo e il dottor Renato Scarinci, per i loro insegnamenti umani e professionali.

Ringrazio le mie compagne di specialità ed amiche, Francesca e Chiara.

Ringrazio tutti coloro che lavorano alla Genetica Medica, chi in ambulatorio, chi in laboratorio, chi come collaboratore...

Voglio poi ringraziare tutti coloro che hanno fatto parte di questo tratto di strada: le amiche e gli amici che ho incontrato a Siena, le amiche e gli amici che pur lontani mi hanno fatto sentire la loro presenza, chi mi è stato vicino per tanti anni, mio fratello e la sua sposa, i miei genitori ed i miei cari che sono mancati.

E definitivamente grazie Tuzzina, che anche questa volta sei qui con me!